UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PALERMO

Dottorato di Ricerca in Medicina Cardiovascolare e Biotecnologie Chirurgiche e Urologiche
Dipartimento di Discipline Chirurgiche, Oncologiche e Stomatologiche
Indirizzo: Biotecnologie Chirurgiche e Medicina Rigenerativa nell'Insufficienza d' Organo
Referente: Prof. Attilio Ignazio Lo Monte

ISOLAMENTO E CARATTERIZZAZIONE DI CELLULE STAMINALI MESENCHIMALI DA TESSUTO ADIPOSO DI RATTO PER IL LORO DIFFERENZIAMENTO IN SENSO ENDOTELIALE

IL DOTTORE
DOTT.SSA ROBERTA ALTOMARE

IL COORDINATORE
PROF. ATTILIO IGNAZIO LO MONTE

IL TUTOR
PROF. ATTILIO IGNAZIO LO MONTE

IL CO-TUTOR
DOTT.SSA ANNALISA GUERCIO

CICLO XXV
ANNO CONSEGUIMENTO TITOLO 2015

CAPITOLO 1: Introduzione

1.1 Le cellule staminali

Si definiscono staminali, cellule non specializzate che godono delle proprietà di autorinnovamento e potenza. Con il termine "potenza" ci si riferisce alla possibilità di tali cellule di dare origine a diversi tipi cellulari attraverso il processo di differenziamento, mentre con "autorinnovamento" ci si riferisce alla capacità di tali cellule di compiere un numero illimitato di cicli replicativi, mantenendo il medesimo stadio differenziativo[i]. Ciascuna cellula staminale realizza l'autorinnovamento tramite la *divisione asimmetrica*, in cui la cellula staminale dà origine ad un'altra staminale e ad una cellula progenitrice destinata a differenziarsi, oppure mediante *differenziamento stocastico*, da cui si originano nuove cellule con caratteristiche di staminalità[ii]. Le cellule staminali vengono classificate in base al loro ***potenziale differenziativo*** (***Figura 1***) e più in particolare:

- **Cellule staminali totipotenti**

Sono cellule presenti solo nelle prime fasi di formazione dell'embrione e sono in grado di dare origine ad un intero organismo. Le staminali totipotenti, infatti, sono in grado di dare origine anche ai tessuti extra-embrionali, quali la placenta. Lo zigote, la prima cellula che si origina dopo la fecondazione, è la cellula staminale totipotente per eccellenza. Il prelievo della "Inner Cell Mass" (ICM) dalla blastocisti al 5° giorno dalla fecondazione costituisce la pratica comune per l'ottenimento di tali cellule[iii].

- **Cellule staminali pluripotenti**

Tali cellule perdono il potenziale morfogenetico, non possono dare origine ad un intero organismo, non essendo in grado di generare tessuti esterni all'embrione. Tuttavia, esse conservano illimitate capacità moltiplicative e proliferative, e danno origine alle cellule dei tre foglietti embrionali: endoderma, mesoderma ed ectoderma[iv].

- **Cellule staminali multipotenti**

Mantengono capacità differenziativa, sebbene inferiore a quella delle cellule pluripotenti; possono dare origine soltanto alle cellule del foglietto embrionale da cui hanno origine (ad esempio, le staminali emopoietiche sono in grado di differenziare naturalmente solo in elementi del sangue). Le cellule staminali somatiche sono multipotenti e risiedono solo nello specifico tessuto a cui sono destinate, allo scopo di soddisfare il fisiologico *turn-over* cellulare[v].

- **Cellule staminali unipotenti**

Sono in grado di formare un unico tipo di cellule, ma conservano la capacità di autorinnovamento. Tali cellule si trovano in diversi tessuti adulti quali pelle, epitelio intestinale e sangue[vi].

Inoltre, in base alla loro ***origine***, le cellule staminali vengono classificate in:

- **Cellule staminali embrionali**

Si trovano esclusivamente negli embrioni a stadi di sviluppo molto precoci. Sono cellule totipotenti o pluripotenti, cioè in grado di produrre tutti i tipi di cellule differenziate che si trovano nei tessuti di un organismo adulto. L'uso di tali cellule, isolate con successo per la prima volta da James Thomson nel 1998, pone due importanti problematiche: la prima è legata alle difficoltà tecniche relative al loro reperimento, la seconda è di natura etica, considerato che l'ottenimento di una cellula staminale embrionale comporta la distruzione dell'embrione stesso[vii].

- **Cellule staminali cordonali**

Sono cellule progenitrici multipotenti indifferenziate, capaci di rigenerarsi autonomamente per numerosi cicli replicativi. La popolazione di cellule staminali cordonali è eterogenea, in quanto consta di diversi tipi cellulari capaci di differenziare verso tessuti endodermici, ectodermici, tessuto cartilagineo, adiposo, osseo, cellule del midollo osseo, del sangue ed in vasi sanguigni[viii].

- **Cellule staminali adulte o somatiche**

Le cellule staminali somatiche possono avere origine sia fetale che adulta e sono tessuto-specifiche. Esse risiedono in specifici distretti tissutali (o nicchie) per dare origine al tipo di cellule differenziate che costituisce il tessuto in cui si trovano; ad esempio, le cellule staminali ematopoietiche (Hematopoietic Stem Cells, HSC). Queste ultime sono le cellule staminali somatiche più studiate e meglio caratterizzate. Esse si trovano prevalentemente negli organi ematopoietici e in particolare nel midollo osseo. Sono capaci di autorinnovarsi, di differenziare in diversi tipi di cellule mature del sangue e di migrare nel torrente circolatorio[ix]. Le cellule staminali adulte persistono durante tutta la vita e svolgono, in genere, funzioni di riparazione tissutale in risposta ad eventi traumatici o al naturale turn-over cellulare. La pluripotenza di questi elementi cellulari e la capacità rigenerativa dei tessuti, suggeriscono un loro possibile uso nell'ambito della medicina rigenerativa. Aspetto di fondamentale importanza è il possibile prelievo di tali cellule dal

paziente stesso (cellule autologhe) ed il conseguente superamento di problematiche inerenti alla risposta immunitaria in caso di trapianto. Questi aspetti, insieme alla mancanza di implicazioni di natura etica, rendono le cellule staminali adulte maggiormente idonee alla sperimentazioni rispetto a quelle embrionali[x].

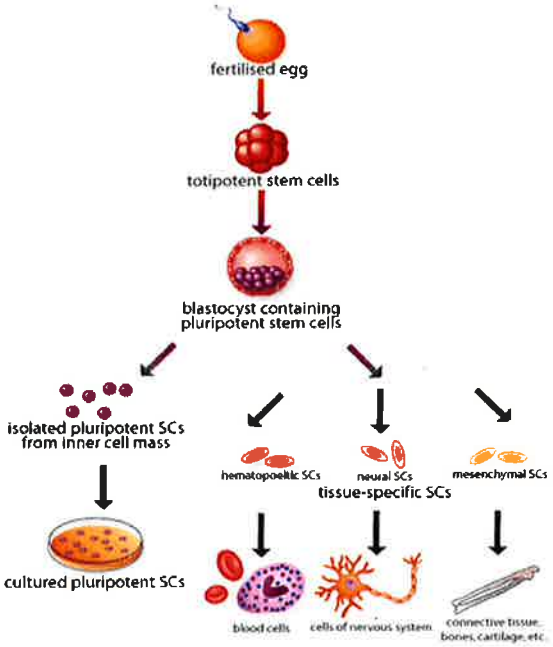


Figura 1. Classificazione delle cellule staminali di diversa origine ontologica.

Cellule Staminali Indotte (iPSC)

Negli ultimi anni sono state sviluppate tecniche idonee alla generazione di cellule staminali pluripotenti indotte (iPSCs), tramite induzione della pluripotenza in cellule adulte, mediata da trasfezione retrovirale con geni di pluripotenza. Le cellule staminali pluripotenti indotte sono dunque cellule somatiche riprogrammate, ad esempio tramite trasduzione lentivirale, per determinare l'espressione di specifici fattori di trascrizione come ad esempio Oct-4, Sox2, NANOG, c-Myc, LIN28 e klf4[xi].

1.2 Cellule Staminali Mesenchimali (CSM)

Sono cellule altamente proliferanti che vanno incontro a *self-renewal* ed in grado di differenziare in tessuti di origine mesenchimale ***(Figura 2).*** Le diverse fonti da cui possono essere isolate ed il loro elevato potenziale di espansione *ex-vivo* ne fanno una interessante risorsa utilizzabile in numerose applicazioni cliniche, sia nel contesto della terapia cellulare e genica, che in medicina rigenerativa[xii]. Le CSM derivano dal mesoderma, il foglietto embrionale intermedio e, pertanto, sono in grado di differenziare in tessuti di origine mesenchimale tra cui lo stroma midollare, il tessuto adiposo, osseo, cartilagineo, tendineo,

muscolare scheletrico ed il mesoderma viscerale. Evidenze sperimentali indicano che sono in grado di differenziare anche in cellule di origine non mesodermica, quali neuroni, cellule epiteliali, endoteliali, epatociti, cellule renali e cellule del polmone[xiii]. Nonostante i primi studi condotti sulle CSM abbiano evidenziato la possibilità di isolarle da midollo osseo, milza e timo[xiv,xv], è oggi noto che diversi altri distretti tissutali sono sede di cellule staminali mesenchimali, come cartilagine, periostio, liquido sinoviale, muscoli e tendini. Sebbene la maggior parte dei dati pubblicati si riferiscano a colture cellulari ottenute da midollo osseo, sono sempre più numerosi gli studi sulle CSM ottenute da fonti alternative, quali tessuto adiposo, sangue periferico, cordone ombelicale e tessuti fetali.

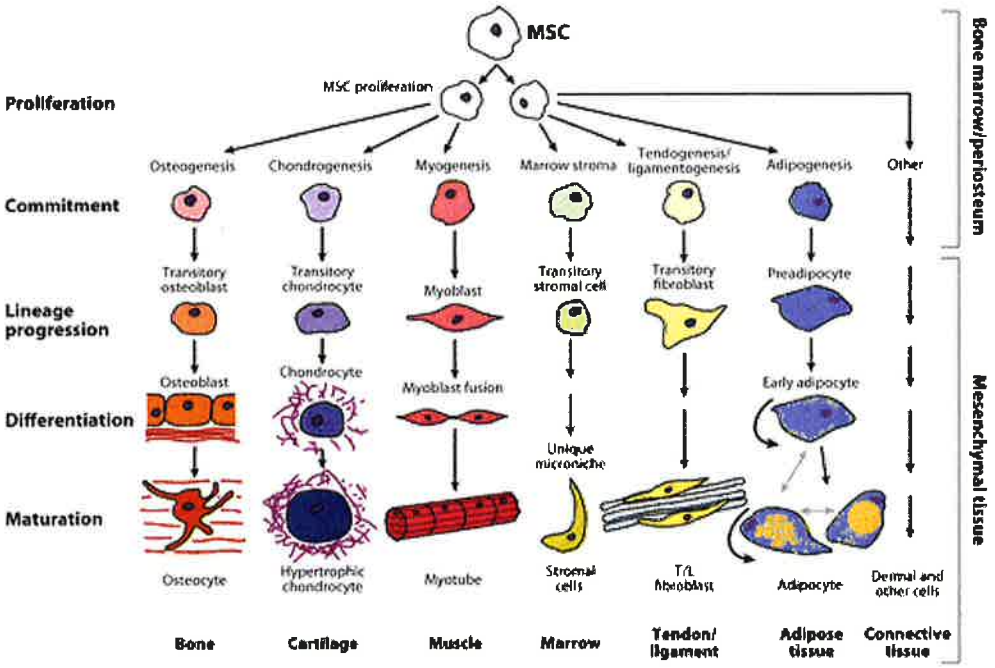


Figura 2: Potenziale differenziativo delle CSM

L'utilizzo di CSM da midollo osseo è limitato da alcune problematiche, quali la procedura invasiva del prelievo di midollo, l'esiguo numero di cellule staminali che si ottengono da ogni prelievo[xvi], la diminuzione della resa quantitativa all'aumentare dell'età del soggetto[xvii,xviii]. Per tali ragioni, si rende necessario un adeguato approfondimento della conoscenza di fonti alternative finalizzate all'approvvigionamento di cellule staminali autologhe tra cui, ad oggi, le più studiate sono i tessuti fetali ed il tessuto adiposo. Quest'ultimo rappresenta un ottimo candidato quale fonte di staminali, vista la sua distribuzione quasi ubiquitaria nel nostro corpo[xix]. *In vitro*, queste cellule presentano molte delle caratteristiche delle CSM ottenute da midollo osseo: l'aderenza al materiale plastico, la morfologia fibroblastoide, la formazione di CFU-F (Unità Formanti Colonie Fibroblastoidi), l'espressione di alcuni markers superficiali ed il potenziale differenziativo in senso osteogenico, adipogenico e condrogenico indotto da opportune stimolazioni.

Attualmente non esistono criteri fenotipici ben definiti per caratterizzare le CSM in quanto non esiste uno specifico marcatore che identifichi univocamente tali cellule. Al fine di ottenere un approccio condiviso per lo studio della biologia delle CSM, il "*Mesenchymal and Tissue Stem Cell Committee of the International Society for Cellular Therapy*" ha elaborato criteri che devono essere soddisfatti per poter caratterizzare una cellula staminale mesenchimale: 1) aderenza delle cellule isolate al materiale plastico, 2) espressione del cluster di differenziamento (CD) costituito dai marcatori di superficie CD105, CD73 e CD90 ed assenza di espressionedi CD34, CD45, CD14 o CD11b, CD19 e CD79a.

Le ***Tabelle 1 e 2*** riassumono le caratteristiche di alcuni antigeni e geni utilizzati per caratterizzare le cellule staminali mesenchimali.

ANTIGENI	CARATTERISTICHE
CD9	Glicoproteina di membrana di 24kDa presente su linfociti B precoci, attivati e su linfociti T attivati, oltre che su piastrine, eosinofili,basofili. L'antigene è un modulatore dell'adesione e della migrazione cellulare, mentre sulle piastrine, che non sono capaci del secondo meccanismo, ha funzione di attivatore.
CD13	Antigene noto anche Aminopeptidasi N. E' una esopeptidasi Zn-dipendente che cliva le proteine target come neuropeptidi e citochine, a partire dall'estremità N-terminale. CD13 è espresso sulle cellule della linea mieloide, cellule dell'epitelio intestinale, placenta, fegato e rene.
CD14	Corecettore deputato al riconoscimento dell'LPS batterico. E' espresso sui macrofagi, sui neutrofili e sulle cellule dendritiche.
CD24	Glicoproteina espressa sulla superficie della maggior parte dei linfociti B.
CD29	Integrina espressa sui leucociti, cellule endoteliali, cellule epiteliali e cellule del muscolo liscio.
CD31	Antigene noto anche come PECAM-1. E' espresso sui macrofagi dove svolge un ruolo chiave nella rimozione dei neutrofili degenerati.
CD33	E' un recettore di membrana presete principalmente nelle cellule della linea mieloide. Lega residui di acido sialico.
CD34	E' una proteina transmembrana espressa su gran parte delle cellule che formano colonie ematopoietiche del midollo osseo, quali progenitori unipotenti(BFU-E, GFU-GM, CFU-Meg, CFU-Eo, CFU-Osteoclasti) e progenitori multipotenti (CFU-Mix O CFU-GEMM, pre-CFU, CFU-blasti), il CD34 risulta espresso ad alti livelli nei progenitori più precoci, diminuendo progressivamente con la maturazione. Il CD34 è un antigene di differenziazione leucocitario stadio-specifico, presente sulle cellule progenitrici linfoidi.
CD44	E' una proteina trasmembrana, monomerica, altamente glicosilata la cui funzione è quella di legare l'acido ialuronico ed altre glicoproteine della matrice extracellulare. E' principalmente

	una molecola di adesione intercellulare espressa sui linfociti.
CD45	E' un enzima della famiglia delle tirosina-fosfatasi, che regola diversi meccanismi cellulari , tra cui l'accrescimento, il differenziamento, e la trasformazione tumorale. E' chiamato anche antigene leucocitario comume.
CD49	Membro della famiglia delle integrine.
CD54	Noto anche come ICAM-1, è una molecola di adesione intercellulare presente sui leucociti e sulle cellule endoteliali.
CD73	Noto anche come 5'-nucleotidasi è un enzima che catalizza la conversione delle purine da mononucleotidi a nucleosidi. E' un marker di differenziamento linfocitario.
CD90	Membro delle superfamiglia delle Ig può essre utilizzato come marcatore per le cellule staminali e per i processi assonali dei neuroni maturi.
CD105	E' una proteina trasmembranaria di tipo I, altamente espressa nelle cellule endoteliali vascolari umane.
CD166	Membro della superfamiglia delle Ig che lega il CD6. E' espresso dai linfociti T attivati, macrofagi attivati, fibroblasti e cellule epiteliali.
CD117	Chiamato anche recettore c-kit. E' un recettore tirosina-chinasi espresso dalle cellule staminali ematopoietiche e a ltri tipi cellulari.
SSEA-3 e 4	Antigeni espressi sulla superficie delle cellule di teratocarcinoma umane e cellule staminali embrionali.
CCR4	Recettore che media le attività biologiche delle chemochine.
c-Met	E' un recettore di membrana essenziale per lo sviluppo embrionale e per la guarigione delle ferite.
ATP-binding cassette trasporter	Proteina transmembrana che usa l'energia derivata dall' idrolisi dell'ATP per trasportare diersi substrati come zuccheri , amminoacidi, proteine e civari metaboliti.
Tra 1-60 e 1-81	Antigeni espressi sulla superficie delle cellule di teratocarcinoma umane e cellule staminali embrionali.

Tabella 1: Caratteristiche dei principali antigeni di superficie.

GENI	CARATTERISTICHE
Oct4	Gene che codifica un fattore di trascrizione coinvolto nell'auto-rinnovamento delle cellule staminali embrionali.

Sox2	Gene che codifica un fattore di trascrizione essenziale per mantenere le cellule staminali embrionali indifferenziate.
Nanog	Gene che codifica un fattore di trascrizione coinvolto nell'auto-rinnovamento delle cellule staminali embrionali.
Notch1	Gene che codifica un recettore trasmembrana implicato nel differenziamento del sistema nervoso e di altre strutture.
GATA4	Gene che codifica per un fattore di trascrizione, che regola geni coinvolti nell'embriogenesi e nel differenziamento del miocardio.
STAT3	Gene che codifica per un fattore di trascrzione ,che regola geni coinvolti nella crescita cellulare e nell'apoptosi.
Rex1	Gene che codifica per una proteina a dita di Zn , espressa ad alti livellli nelle cellule staminali embrionali e nelle cellule di teratocarcinoma.
BMP4	Gene che codifica per una proteina della famiglia BMP. Questa proteina è coinvolta nello sviluppo delle ossa, della cartilagine e nel differenziamento dell'embrione.
c-Myc	Gene che codifica per un fattore di trascrizione , che regola la crescita cellulare , l'apoptosi, la differenazione e l'auto-rinnovamento delle cellule staminali.
GAPDH	Enzima che catalizza la sesta reazione della glicolisi. Sembra essere coinvolto nell'attivazione della trascrizione e nelle fasi inziali dell'apoptosi.
Klf4	Gene che codifica per un fattore di trascrizione che funge da attivatore o da repressore a dipendentemente dai fattori con cui interagisce.
Nestina	Gene che codifica per una proteina dei filamenti intermedi (IF) di tipo VI, espressa nelle cellule.

Tabella 2: Caratteristiche generali dei geni utilizzati per caratterizzare le MSCs

L'espressione genica è un altro dei possibili criteri utilizzabili per la caratterizzazione delle cellule staminali. La pluripotenza di una cellula staminale dipende dall'espressione dei geni per i fattori di trascrizione Oct 3/4, c-Myc, Sox-2 e Kfl4, e del gene *NANOG* che codifica per una proteina homeobox. La trasfezione di fibroblasti umani con questi geni ha, infatti, determinato la riprogrammazione di tali cellule in staminali pluripotenti (iPSCs). Il ruolo chiave rivestito da *OCT-4, NANOG e SOX2* nel mantenimento della staminalità li rende marcatori di riconoscimento per le cellule indifferenziate.

Oct-4 (Octamer-Binding Transcription Factor 4) è una proteina coinvolta nell'auto-rinnovamento di cellule embrionali indifferenziate. Essa è codificata dal gene *POU5F1*, è presente nei blastomeri, nelle cellule della linea germinale, nella *Inner Cell Mass (ICM)*, ma non nel trofoblasto[xx]. Regola la trascrizione di numerosi geni, interagendo con fattori di

trascrizione Nanog e Sox 2; quest'ultimo, è richiesto per la trascrizione di *OCT-4* stesso. La trascrizione di *OCT-4* avviene in seguito ad eventi di demetilazione del DNA ed è noto che concentrazioni differenti della proteina sono determinanti per il differenziamento del tessuto embrionale.

Infatti, livelli elevati di espressione genica determinano il differenziamento in ipoblasto, livelli intermedi in ICM , mentre l'assenza della proteina determina il differenziamento in trofoectoderma[xxi]. Nelle prime fasi dello sviluppo embrionale, il gene *OCT-4* è espresso in tutte le cellule delle blastocisti e la sua assenza blocca irreparabilmente lo sviluppo del feto.

Raggiunto lo stadio di morula, i livelli di espressione di alcune proteine vengono regolati in modo diverso a seconda della posizione occupata da ciascuna cellula nella morula stessa. Si verifica una down-regolazione dei livelli di espressione di *OCT-4* nelle cellule più esterne e ciò, oltre a determinare la perdita della pluripotenza, segna la prima tappa del differenziamento cellulare: la formazione del trofoblasto. All'interno della morula, invece, i livelli di espressione di Oct-4 restano inalterati, indirizzando tali cellule verso la costituizione dell'ICM[xxii]. Durante la gastrulazione avviene un processo analogo in cui la riduzione dei livelli di espressione di *OCT-4*, oppure il calo di un altro fattore capace di inibire il differenziamento (LIF), fanno sì che le cellule staminali embrionali comincino differenziare in mesoderma o endoderma. Negli stadi successivi, la presenza di Oct-4 si riduce ulteriormente, rimanendo confinata alle cellule germinali primordiali, futuri precursori dei gameti[xxiii].

Nell'adulto, soltanto le cellule germinali e le cellule staminali adulte esprimono il gene *OCT-4*. *SOX-2* (SRY box-containing factor 2) è un altro gene che codifica un fattore di trascrizione essenziale per mantenere le cellule staminali embrionali indifferenziate. In particolare, esso forma un eterodimero con *OCT-4* e regola positivamente la trascrizione dei geni *POU5F1, SOX-2* e *NANOG*. *NANOG* interagisce direttamente con *OCT-4* regolando ulteriormente l'espressione dei tre geni. Dunque, come mostrato nella ***Figura 3*** i tre fattori di trascrizione regolano vicendevolmente la loro espressione e determinano un network di eventi necessari per il mantenimento della pluripotenza[xxiv].

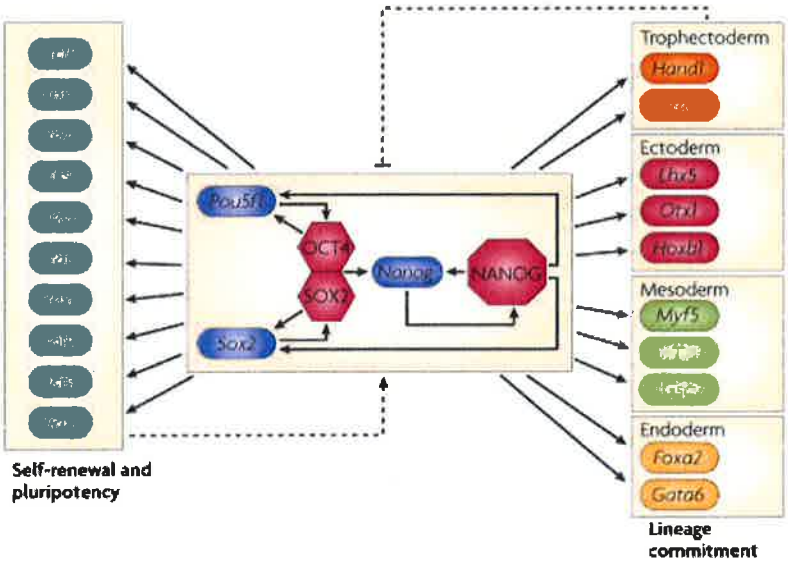


Figura 3: network di regolazione tra i geni di staminalità OCT4, SOX 2 e NANOG

Come detto in precedenza, le cellule staminali mesenchimali sono in grado di differenziare anche in cellule di origine non mesodermica[xxv]. Lo studio dei meccanismi molecolari alla base della multipotenza delle CSM ha permesso significativi progressi nella comprensione delle vie di differenziamento in senso osteogenico, condrogenico ed adipogenico e ciò è di peculiare importanza per il loro impiego nelle tecniche di ingegneria tissutale ed a scopo terapeutico.

Il gene *RUNX 2*, codificante per l'omonimo fattore di trascrizione, è il principale regolatore del differenziamento osteogenico[xxvi]. Runx2 agisce in sinergia con il Transformin Growth Factor β (TGF-β), determinando l'up-regolazione dell'espressione dell'interleuchina 11 (IL-11). Questi eventi promuovono il differenziamento delle cellule in condrociti ed osteoblasti, inibendo l'adipogenesi[xxvii] che, invece, risulta essere indotta da *PPARy* (Peroxisome Proliferator Activated Receptor γ) tramite l'inibizione dell'espressione di Runx2[xxviii].

La capacità delle CSM di differenziare in adipociti è stata ampiamente studiata e *PPAR-γ* gioca un ruolo fondamentale in questo processo, regolando la funzione di molti geni specifici[xxix]. Il differenziamento delle CSM in adipociti può essere indotto *in vitro* dopo esposizione delle cellule a fattori esogeni quali insulina, desametasone, isobutilmetilxantina e indometacina, in grado di aumentare l'espressione di *PPARγ*[xxx,xxxi].

Per il differenziamento in osteoblasti, il principale induttore è *OSTERIX*[xxxii] . *In vitro* le CSM possono essere indotte a differenziare in osteoblasti in seguito alla somministrazione di fattori di crescita, quali BMP (Bone Morphogenetic Proteins), o ponendole in mezzi di

coltura arricchiti con desametasone e acido ascorbico[xxxiii,xxxiv]. La condrogenesi è un evento multi-step, che richiede l'esposizione delle CSM a diversi fattori di crescita in grado di determinare la over-espressione dei geni Sox9, Sox5 e Sox6[xxxv,xxxvi]. Inoltre, è stato dimostrato che TGF e BMP-2, se co-somministrati, determinano un potenziamento del differenziamento condrogenico[xxxvii].

Il tessuto adiposo come fonte di CSM

Il tessuto adiposo è la principale riserva di energia del corpo ed è quasi ubiquitariamente distribuito. I principali componenti cellulari sono gli adipociti, uniche cellule capaci di immagazzinare trigliceridi nel loro citoplasma senza che la loro integrità funzionale venga alterata[xxxviii]. Quando il bilancio energetico è positivo, gli adipociti si arricchiscono in trigliceridi e vengono richiamate cellule progenitrici affinchè si originino nuove cellule adipose[xxxix,xl]. Dapprima considerato come un tessuto di riserva deputato al bilancio energetico, oggi il tessuto adiposo è riconosciuto come un organo coinvolto nei più importanti processi metabolici dell'organismo, nonché come fonte di cellule dotate di potenziale rigenerativo. L'intervento sui tessuti molli mediante innesto di grasso autologo è una procedura comune in chirurgia plastica e risulta essere efficace e immunologicamente sicura. Tuttavia, questa procedura deve essere ripetuta più volte a causa del riassorbimento dell'innesto determinato sia dal carente apporto di nutrienti negli strati più interni dell'innesto stesso, sia a causa dello stato differenziato delle cellule utilizzate[xli]. Per ovviare a tale problema, cellule autologhe estratte da tessuto adiposo potrebbero essere coltivate e mantenute allo stato non differenziato ed utilizzate per gli innesti[xlii]. Per questo motivo e per la loro capacità di differenziare in altri tipi cellulari, è indispensabile approfondire le conoscenze sulle cellule staminali estratte da tessuto adiposo, sulle tecniche di isolamento, mantenimento in coltura e differenziamento.

Le cellule staminali mesenchimali estratte da tessuto adiposo (ADMSCs) sono multipotenti, possono differenziare in vari tipi di cellule, tra cui osteociti, adipociti, cellule nervose, cellule endoteliali vascolari, cardiomiociti, β-cellule pancreatiche ed epatociti, suscitando un crescente interesse scientifico in termini di potenziale applicazione terapeutica nella pratica clinica.

Nel campo della medicina rigenerativa, l'uso di cellule autologhe è preferibile all'uso delle cellule staminali embrionali o delle cellule staminali pluripotenti indotte. Pertanto, le ADMSCs sono una risorsa utile per lo screening di farmaci e per la medicina rigenerativa.

Negli animali da esperimento, le CSM possono essere ottenute da tessuto adiposo sottocutaneo e viscerale, vengono mantenute in coltura per diversi passaggi cellulari mantenendo il loro fenotipo e confermando, quindi, la loro idoneità per la coltivazione *in vitro*[xliii].

Possibili applicazioni delle CSM

Uno dei più promettenti campi di impiego delle CSM è rappresentato dalla malattie osteoarticolari. Le CSM possono essere impiegate nel facilitare la guarigione di fratture, osteonecrosi ed escissioni di porzioni di tessuti tumorali[xliv]. La ricostruzione chirurgica di lesioni muscolari traumatiche, che comporta la perdita di vaste aree di tessuto, risulta spesso non risolutiva ed è noto che le CSM adulte hanno la capacità di colonizzare e rigenerare il muscolo danneggiato[xlv]. Inoltre, i segnali provenienti da muscoli danneggiati promuovono il differenziamento miogenico[xlvi] e l'iniezione endovenosa di cellule staminali mesenchimali in modelli di distrofia muscolare di Duchenne ha mostrato il differenziamento di CSM in fibre muscolari e parziale ripristino dell'espressione della distrofina[xlvii]. I danni ai nervi periferici sono attualmente trattati con l'innesto del nervo e risultati preliminari di alcune linee di ricerca suggeriscono che le CSM possono contribuire alla riparazione del nervo stesso.

I difetti ossei rappresentano una grande sfida sia per la chirurgia traumatologica che per l'ingegneria dei tessuti. Recenti ricerche condotte da Peterson et al.[xlviii] dimostrano che le CSM poste su supporti di diversa origine favoriscono la completa saldatura tra l'impianto e l'osso. E' inoltre nota la proprietà delle cellule staminali mesenchimali di promuovere l'angiogenesi e questo potrebbe essere sfruttato a favore dei pazienti con danni cutanei estesi[xlix]. Studi recenti mettono in evidenza il grande potenziale di rigenerazione delle cellule staminali mesenchimali e la loro efficacia nel trattamento di diverse patologie. La loro applicazione sembra essere sicura ed è priva di controversie etiche. Tuttavia, le metodologie e le tecniche riportate nella vasta letteratura presentano numerose differenze e variabili, rendendo difficile il confronto dei risultati. L'ottimizzazione delle tecniche e la standardizzazione dei protocolli permetteranno una più solida comprensione delle caratteristiche e potenzialità delle CSM consentendo il loro uso in nuovi ambiti terapeutici.

Differenziamento di cellule staminali mesenchimali estratte da tessuto adiposo in cellule endoteliali

La disfunzione endoteliale è una complicanza comune a condizioni quali malattia coronarica, diabete mellito, ictus, disfunzione erettile e insufficienza renale[l]. Una strategia per ripristinare la funzione endoteliale è l'angiogenesi terapeutica tramite la rivascolarizzazione del tessuto ischemico[li]. Evidenze sperimentali indicano che cellule staminali estratte da tessuto adiposo differenziano in cellule endoteliali, se poste in terreni di coltura contenenti IGF-I e VEGF. L'analisi immunocitochimica permette di rivelare che le cellule differenziate esprimono marker specifici dell'endotelio vascolare (CD31) ed il fattore di Von Willebrand, mostrando una down-regolazione dell'espressione di CD34. Per chiarire il meccanismo che porta al differenziamento endoteliale delle cellule staminali estratte da tessuto adiposo, Ning et al. hanno condotto esperimenti ponendo le ADMSCs in terreni di coltura arricchiti con bFGF, EGF, VEGF, IGF-I, idrocortisone, eparina e vitamina C, in comparazione a colture cellulari ciascuna priva di uno dei fattori sopra citati. Le osservazioni hanno suggerito che l'espressione del marker di differenziamento endoteliale CD31 risulta assente nelle colture prive di bFGF e VEGF, indicando il loro ruolo prevalente nel differenziamento endoteliale[lii].

CAPITOLO 2: Obiettivi della tesi

L'obiettivo del progetto "*Isolamento ed utilizzo di cellule staminali adulte derivate da tessuto adiposo di ratto e loro differenziamento in cellule endoteliali per il ripristino della funzione renale*" approvato e finanziato dal Ministero della Salute è quello di valutare, in modelli animali, il potenziale terapeutico delle ADMSCs nelle patologie renali da danno ischemico.

Notevoli sono i risvolti applicativi dello studio nell'ambito della medicina rigenerativa. Il ripristino delle funzioni renali, in particolare nei casi in cui la loro compromissione è da addebitare ad un danno del microcircolo, potrebbe essere ottenuto con la sostituzione delle cellule necrotiche con cellule sane. Dal momento che la capacità di rigenerazione delle cellule tubulari è fisiologicamente ristretta o assente in pazienti che manifestano danni a carico del rene stesso, è importante trovare fonti di cellule alternative per la rigenerazione renale. Per sopperire alla carenza di donatori d'organo e per migliorare le aspettative di guarigione che derivano dall'uso di organi marginali, si guarda sempre con maggiore interesse alle cellule staminali.

Lo studio richiede la collaborazione tra soggetti con diverse competenze: veterinari , biotecnologi, chirurghi. Nell'ambito delle fasi preliminari della realizzazione del progetto, il gruppo di lavoro ha messo a punto tecniche di:

- Estrazione di cellule staminali da campioni di grasso viscerale e sottocutaneo prelavato da ratti Wistar tenuti in regime ipercalorico;
- Verifica del mantenimento delle caratteristiche morfologiche e biologiche "*in vitro*";
- Caratterizzazione delle CSM tramite saggio delle Unità Formanti Colonie Fibroblastoidi (CFU-F assay);
- Valutazione delle diverse caratteristiche e potenzialità delle cellule provenienti dai due differenti distretti corporei;
- Differenziamento di CSM in adipociti, osteociti e condrociti al fine di caratterizzare le cellule;
- Valutazione dell'espressione dei geni staminalità *OCT-4*, *SOX-2*, *NANOG* nei diversi passaggi cellulari;

- Analisi immunofenotipica delle CSM isolate;
- Differenziamento in senso endoteliale e valutazione dell'acquisizione del fenotipo caratteristico;
- Valutazione dell'acquisizione del fenotipo endoteliale tramite espressione dei geni markers di differenziamento endoteliale e di antigeni di superficie.

CAPITOLO 3: Materiali e metodi

3.1 Isolamento di CSM da tessuto adiposo e mantenimento in coltura

Il tessuto adiposo sottocutaneo è stato prelevato dai ratti tramite ago-aspirazione, previa anestesia, effettuata con l'uso di Medetomidina 0,5 mg/ml al dosaggio di 15 mcg/kg. Tale procedura è stata eseguita secondo quanto previsto dal D.L. 116/92 e dalla Direttiva 201/63/UE. Il tessuto adiposo prelevato è immerso in soluzione salina addizionata di antibiotici e antimicotici al 5% (penicillina, streptomicina ed amfotericina b) e mantenuto un'ora a temperatura ambiente per favorire la decontaminazione da eventuali agenti microbici. Il campione viene pesato, frammentato meccanicamente e sottoposto a ripetuti lavaggi (almeno 3) con Hank's Balanced Salt Solution (HBSS, *PAA the Cell Colture Company*) addizionata di antibiotici e antimicotici al 2%. Dopo aver eliminato la soluzione salina, il campione viene posto in una beuta con una soluzione di collagenasi tipo 1A (*GIBCO*) allo 0,2% (20 ml di enzima/grammo di tessuto da digerire), in Phosphate Buffered Saline (PBS) addizionato di antibiotici all'1%. La collagenasi agisce sul collagene, che compone la matrice extracellulare, permettendo l'isolamento cellulare dallo stroma che compone il tessuto adiposo. Il PBS è una soluzione salina a base acquosa contenente cloruro e fosfato di sodio o, in alcune formulazioni, cloruro e fosfato di potassio. I gruppi fosfato del buffer permettono di mantenere costante il pH. Il campione viene posto a 37°C in bagno termostatico, in agitazione, per 2-3 ore fino a completa digestione. Al termine del processo, l'attività dell'enzima viene neutralizzata aggiungendo Siero Fetale Bovino (SFB, *Euro Clone*) al 20%. Quindi, il tessuto digerito viene filtrato attraverso garze sterili, posto in tubi da 50 ml e centrifugato a 2700 giri per 10 minuti a temperatura ambiente. Il surnatante, ricco di gocciole lipidiche derivate dalla disgregazione degli adipociti, è eliminato. Il pellet cellulare ottenuto viene risospeso in 10 ml di Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) (1 g/L di glucosio), addizionato di SFB al 20% e contenente una soluzione di antibiotici-antimicotici al 1%, e centrifugato 2 volte a 1400 giri per 10 minuti a temperatura ambiente. Il pellet viene risospeso in 10 ml di terreno nuovo, filtrato attraverso filtri da 70 μm e centrifugato nuovamente, seguendo le precedenti condizioni, al fine di eliminare ogni residuo di soluzione enzimatica.

Il pellet, infine, viene risospeso in 3 ml di terreno e viene eseguita una conta di vitalità cellulare con Trypan Blue in camera di Burker. Poichè il colorante è in grado di penetrare solo all'interno delle cellule la cui membrana cellulare è disgregata, alla visione al microscopio, le cellule vive avranno un citoplasma chiaro, mentre quelle non vitali si

coloreranno di blu. Le cellule vengono poste in fiasche da 25 cm^2 ad una concentrazione di 50.000 cellule/ml di terreno ed incubate a 37°C in atmosfera di CO_2 al 5%.

Dopo 48 ore di incubazione, viene eseguito il primo cambio di terreno per eliminare la componente cellulare non adesa (cellule ematiche fisiologicamente presenti nel tessuto).

Quando le cellule mesenchimali in coltura hanno raggiunto una confluenza di circa l'80% vengono effettuate le subcolture (passaggi cellulari) che prevedono un preliminare trattamento enzimatico. Il terreno viene aspirato e le piastre vengono sopposte a lavaggio con PBS. La soluzione viene eliminata, si aggiunge la soluzione enzimatica tripsina 0,05% - EDTA 0,02% in modo da indebolire le interazioni cellulari, consentendo il distacco delle cellule dalla plastica a cui aderiscono. La tripsina, un enzima proteolitico, ha specificità per lisina e arginina, mentre l'EDTA è un chelante degli ioni bivalenti implicati nell'interazione cellulare. Le cellule vengono incubate per qualche minuto a 37°C e successivamente l'azione della tripsina viene bloccata con terreno contenente SFB. La sospensione cellulare viene raccolta in tubi da 15 ml e centrifugata. Il pellet ottenuto è risospeso in DMEM (1g/L di glucosio) addizionato di SFB al 20% e una soluzione di antibiotici-antimicotici al 1%. Al termine di ogni passaggio cellulare si effettua la conta con camera di Burker e si seminano 50.000 cellule/ml di terreno e vengono incubate a 37°C al 5% di CO_2.

3.2 Controlli microbiologici

I controlli microbiologici, atti ad escludere la presenza di agenti contaminanti quali batteri e miceti vengono eseguiti sul tessuto, immediatamente dopo il prelievo dall'animale e sulle cellule ottenute mediante la procedura di isolamento. Batteri e miceti possono contaminare sia i substrati cellulari che i mezzi di coltura mentre i micoplasmi, batteri endocellulari sprovvisti di parete, sono usualmente responsabili della contaminazione delle colture.

In particolare, la presenza di batteri e miceti è rilevata mediante controllo macroscopico del mezzo di coltura, che se inquinato si presenta torbido e virato di colore per acidificazione del pH rilevata da un opportuno indicatore. Per escludere del tutto eventuali contaminazioni, il materiale in esame viene seminato in substrati che consentono la crescita di batteri e miceti, quali Agar Sangue, Plate Coun Agar (PCA) e Agar Sabouraud. La contaminazione da micoplasmi, generalmente sostenuta da *Mycoplasma hyorinis*, *Mycoplasma argini*, *Mycoplasma orale* e *Acheloplasma laidlawii*, è indagata mediante

Real Time PCR (DNA Purification Kit for the MycoSensor QPCR Assay Kit, Agilent Thecnologies).

3.3 Caratterizzazione delle CSM

Le cellule staminali mesenchimali ottenute dal tessuto adiposo vengono caratterizzate tramite due test *in vitro*:

Saggio delle Unità Formanti Colonie (CFU)

Il test permette di verificare la capacità delle cellule isolate di formare colonie. A tale scopo, cellule isolate da tessuto adiposo di ratto, in corrispondenza dei passaggi celluari 1, 3 e 5 vengono poste in piastre da 6 pozzetti alla concentrazione di 100, 75, 50, 25, 10, 5 cellule/cm^2 in terreno di coltura in DMEM (1g/L di glucosio) addizionato di SFB al 5% e una soluzione di antibiotici-antimicotici al 1% ed incubate a 37°C al 5% di CO_2. Il cambio terreno viene effettuato ogni 3 giorni. La formazione di colonie di elementi cellulari viene osservata al microscopio ottico rovesciato (100-250X) in media dopo 5-7 giorni dalla semina. Il tempo che intercorre tra la semina e la formazione di colonie è generalmente correlato alle caratteristiche del campione in esame, all'età del soggetto da cui il campione è prelevato ed al distretto corporeo di prelievo. Dopo 13- 15 giorni, le colonie ottenute vengono sottoposte ad un lavaggio con PBS, fissate con metanolo, colorate con Giemsa e contate. La colorazione di Giemsa permette di discriminare le componenti cellulari sulla base della loro interazione con i coloranti presenti in soluzione

Per il conteggio delle CFU si considerano soltanto i cluster con più di 50 cellule. L'efficienza clonogenica, ovvero la capacità di una singola cellula di dare origine ad una colonia, viene calcolata come il numero di colonie per 100 cellule seminate ai 3 passaggi cellulari considerati.

Differenziamento in linee cellulari mesodermiche (condrocitica, adipocitica ed osteocitica).

La caratterizzazione delle CSM mediante differenziamento, permette di verificare la multipotenza delle cellule isolate mantenute in coltura. Per tale indagine, le cellule vengono coltivate in specifici terreni induttivi, contenenti fattori che determinano il differenziamento verso tre diverse linee cellulari: condrocitica, adipocitica ed osteocitica.

- Differenziamento condrogenico

Le CSM destinate al differenziamento verso la linea condrocitica vengono risospese in terreno colturale NH Chondro Diff (*Miltenyi Biotec*) ad una concentrazione finale di $1x10^6$ cell/mL. Le cellule sono mantenute in coltura per 30 giorni in provette a fondo conico da 15 ml ed incubate a 37°C in atmosfera di CO_2 al 5%. Il cambio terreno è effettuato ogni 3 giorni. Dopo centrifugazione a 1500 rpm per 5 min, il terreno di mantenimento viene aspirato e le cellule risospese in 1 ml di terreno previamente riscaldato. L'avvenuto differenziamento è confermato dalla formazione del nodulo di condrociti e dalla colorazione ematossilina eosina di sezioni del nodulo fissate su vetrino.

Colorazione con il metodo ematossilina-eosina

E' una colorazione bicromica che si basa sul diverso valore di pH dei vari tessuti e dei vari organelli costituenti la cellula. Il nucleo, i vari componenti acidi del citoplasma (ribosomi, secreti acidi), le proteine di membrana e le membrane cellulari, essendo basofili, vengono colorati in viola dall'ematossilina, mentre il citoplasma, le proteine cellulari, le proteine mitocondriali, le fibre di collagene ed i vari tessuti basici (muscolare, connettivo, osseo), detti acidofili, vengono colorati in rosa da una miscela acida di eosina-orange G.

I campioni destinati all'esame istologico, prima di essere trattati, necessitano di un opportuno periodo di fissazione in formalina al 10%, che può variare da 2 fino ad un massimo di 20 giorni, in rapporto alle dimensioni del campione stesso. I campioni vengono poi paraffinati, sezionati al microtomo e posti su vetrini. I vetrini vengono trattati con xilolo e alcool etilico a concentrazioni decrescenti, colorati con ematossilina eosina, lavati con acqua distillata e trattati nuovamente con alcool etilico e xilolo. Il vetrino, quindi, può essere osservato al microscopio.

- *Differenziamento osteogenico*

Le CSM destinate al differenziamento verso la linea osteocitica vengono risospese in NH OsteoDiff Medium (*Miltenyi Biotec*) alla concentrazione finale di $3x10^4$ cellule/ml e poste su piastre a sei pozzetti. Le cellule vengono coltivate per tre settimane, incubate a 37°C in atmosfera al 5% di CO_2, effettuando un cambio terreno ogni 3 giorni. La colorazione "von Kossa" viene utilizzata per la visualizzazione di depositi calcificati della matrice extracellulare.

Colorazione "von Kossa":

La colorazione "von Kossa" sfrutta una reazione fotochimica nella quale ioni argento reagiscono con i fosfati ed é usata per quantificare la mineralizzazione di un tessuto o di

una cellula. Il metodo si basa su una reazione di sostituzione determinata da trattamento del tessuto con una soluzione di nitrato d'argento. In particolare, l'argento cationico presente in soluzione si sostituisce al calcio nel sale originario (fosfato di calcio), formando un sale d'argento che viene evidenziato dopo riduzione dello ione. Poiché il calcio è presente nei tessuti dei mammiferi essenzialmente sotto forma di calcio carbonato e fosfato, il metodo è da considerarsi idoneo a rilevarne la presenza.

Per la colorazione "von Kossa", le cellule sono fissate in formalina al 10% per 30 minuti a temperatura ambiente, lavate in acqua deionizzata ed incubate per 1h con nitrato d'argento al 5% in esposizione a raggi UV. L'eventuale colorazione viene fissata aggiungendo soluzione acquosa di sodio tiosolfato al 5%. Con questa colorazione i depositi di calcio, sostituiti da quelli d'argento, vengono facilmente evidenziati in nero.

- Differenziamento adipogenico

Per il differenziamento verso la linea adipocitica, le cellule vengono risospese in MesenCult Adipogenic Medium (Stemcell Technologies) alla concentrazione di $5x10^4$ cellule/ml e poste in piastre a sei pozzetti. Le cellule sono coltivate per 21 giorni incubate a 37°C in atmosfera al 5% di CO_2, effettuando un cambio terreno ogni 3 giorni. La colorazione "Oil Red O" é utilizzata per esaminare la formazione di accumuli lipidici.

Colorazione "Oil Red O"

Il colorante Oil Red O, liposolubile, si lega selettivamente ai lipidi neutri. Per la colorazione Oil RedO, le cellule sono fissate in formalina al 10% per 30 minuti a temperatura ambiente, quindi addizionate di 2 ml di isopropanolo al 60% per 2-5 min. L'isopropanolo viene aspirato, aggiunto il colorante Oil Red O e, trascorsi 5 min, le cellule vengono sottoposte a lavaggio con acqua deionizzata. Infine, viene aggiunta l'ematossilina per evidenziare i nuclei delle cellule. L'eccesso di ematossilina viene rimosso tramite successivi lavaggi con acqua deionizzata e le cellule osservate al microscopio.

3.4 Differenziamento Endoteliale

Le CSM destinate al differenziamento verso la linea endoteliale, sono poste in fiasche da 25 cm^2, alla concentrazione di $5x10^5$ cellule/ml, in terreno di coltura EGM-2 (EGM-2 Bullet kit – Euroclone) arricchito con fattori di crescita in grado di indurre il differenziamento cellulare: VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor), FGF (Fibroblast Growth Factor), EGF (Epidermal Growth Factor), Acido Ascorbico (Vit. C),

Hydrocortisone, Long R3-IGF-1 (Recombinant Insulin-Like Growth Factor), Eparina. Le cellule vengono incubate a + 37°C in atmosfera arricchita di CO_2 al 5% ed il mezzo di coltura è stato cambiato ogni 3 giorni. Quando le cellule hanno raggiunto una confluenza di circa l'80%, vengono effettuate le subcolture che hanno previsto la digestione del monostrato cellulare con soluzione enzimatica di tripsina 0,05% - EDTA 0,02%. Quindi, una parte del pellet cellulare è raccolto per l'estrazione dell'mRNA ai fini della valutazione dei livelli di espressione dei geni indicatori di staminalità, OCT4, SOX-2 e NANOG e dei geni indicatori di differenziamento endoteliale CD31, CD144 e CD146, mentre una parte è destinata allo studio immunofenotipico tramite citofluorimetria.

3.5 Analisi di espressione genica

Al fine di procedere con l'analisi dei livelli di espressione dei geni marcatori di staminalità (*OCT-4*, *SOX-2* e *NANOG*) e dei geni indicatori di differenziamento in senso endoteliale *(CD31, CD144* e *CD146)*, i pellet cellulari, prelevati da passaggio cellulare 0 a passaggio 5, sia in terreno D-MEM che in terreno di differenziamento EGM-2, sono processati per l'estrazione del mRNA. Tutti i campioni di mRNA, sono retrotrascritti prima di essere saggiati in Real Time PCR Sybr Green. L'espressione dei geni in esame è normalizzata con quella del gene housekeeping per la Gliceraldeide- 3-Fosfato Deidrogenasi (*GADPH*). Tutte le coppie di primers sono state appositamente disegnate, partendo da ciascuna sequenza genica depositata in GeneBank, grazie all'uso del software Primer Express.

Estrazione RNA

L'RNA totale è estratto dalle cellule usando *RNAspin mini RNA isolation kit (GE Healthcare).* L'RNA viene conservato a -80°C fino al successivo impiego.

Retrotrascrizione in cDNA

La retrotrascrizione (RT-PCR) consente di ottenere il DNA complementare all'RNA di partenza (cDNA) sfruttando l'azione dell'enzima trascrittasi inversa. A tal fine, ogni campione di RNA purificato viene retrotrascritto utilizzando il kit SuperScript VILO (Invitrogen).

La reazione è suddivisa in due fasi: nella prima fase il filamento di RNA è retrotrascritto nel cDNA complementare. Avvenuto tale processo, l'RNAsi presente nella mix di reazione, degrada i filamenti di RNA originari usati come stampo ed il cDNA viene amplificato.

Real-Time PCR SYBR Green

Gli strumenti per PCR Real Time, oltre a fungere da termociclatori, eccitano i fluorocromi presenti nei campioni e convogliano quindi la fluorescenza emessa in risposta ad uno spettrografo. Appositi software acquisiscono lo spettro di emissione di ogni singolo campione per tutta la durata della PCR e convertono la variazione di fluorescenza in una rappresentazione in tempo reale della cinetica d'amplificazione. Il SYBR Green è un composto organico aromatico (formula molecolare $C_{32}H_{37}N_4S$) facente parte del gruppo delle cianine asimmetriche, molecole dotate di attività fluorofora ed è utilizzato in biologia molecolare quale colorante di acidi nucleici, in quanto agente intercalante di DNA a doppio filamento (dsDNA). La metodica SYBR Green offre diversi vantaggi: possono essere utilizzati primers in uso in PCR qualitativa e non è costosa. E' pur vero che, essendo il legame al DNA aspecifico, la molecola fluorescente lega anche gli eventuali dimeri di primers. È dunque necessario ottimizzare la metodica per evitare la formazione di prodotti aspecifici. Per l'interpretazione dei risultati ottenuti è previsto l'uso di un reference. Si tratta di un gene cui si fa riferimento per la quantificazione relativa dell'espressione dei geni d'interesse. Geni *Housekeeping* (*GAPDH, B-actina*, subunità ribosomali) sono comunemente utilizzati come references, in quanto sono:

- geni ubiquitari
- espressi in maniera costitutiva
- non risentono dei trattamenti sperimentali
- mantengono la loro espressione costante nei diversi tipi cellulari.

La lettura dei risultati viene effettuata verificando la presenza/assenza di una curva sigmoide in corrispondenza del pozzetto relativo al campione in esame, ad un valore di Ct minore di 40. La specificità della reazione è verificata attraverso la presenza di un singolo picco di temperatura di melting (Tm) registrato nella curva di dissociazione dei primers. L'elaborazione statistica dei risultati viene effettuata attraverso l'uso del software *REST 2009* (Relative Expression Software Tool) V. 2.0.13.

3.6 Analisi immunofenotipica

L'analisi immunofenotipica delle CSM e delle cellule indotte al differenziamento endoteliale, prelevate a ciascun passaggio cellulare (da passaggio 0 a passaggio 5) viene condotta in citofluorimetria, utilizzando il citometro a flusso *FACS CANTO II* a sei canali.

La citofluorimetria consente di eseguire analisi quantitative e qualitative del campione, misurando le caratteristiche fisiche e chimiche di particelle microscopiche. Il principio si fonda sulla focalizzazione idrodinamica delle particelle. Vengono generati dei segnali dipendenti dalle caratteristiche fisiche e dalla presenza di marcatori fluorescenti sulla superficie, nel citoplasma o nel nucleo della cellula. Tramite i segnali di *Forward Scatter* (FSC) e *Side Scatter* (SSC), il citofluorimetro mostra un diagramma di dispersione, chiamato "Citogramma", nel quale è possibile distinguere le varie popolazioni cellulari del campione solo in base alle loro caratteristiche fisiche.

Il *Forward scatter*, o *scatter* ha una intensità proporzionale al diametro della cellula. Il *Side scatter*, o *scàtter* ad ampio raggio ha intensità proporzionale al diametro, alla granulosità interna, alla rugosità di membrana, al rapporto nucleo-citoplasma della cellula. Le cellule possono essere trattate con procedimenti citochimici allo scopo di marcare con opportuni fluorocromi i componenti cellulari da determinare quantitativamente tramite l'eccitazione del fluorocromo e l'emissione di fluorescenza. I segnali emessi vengono raccolti da un sistema di lenti, specchi semitrasparenti e filtri ottici ed inviati ai relativi sensori che ne misurano l'intensità. I segnali (analogici) provenienti da ogni sensore vengono digitalizzati, associati tra loro ed inviati ad un analizzatore-elaboratore che provvede alla presentazione dei dati e alla loro definizione statistica.

Dunque, le CSM vengono staccate dalle fiasche di coltura, centrifugate e risospese in terreno di coltura D-MEM o EGM-2. Per l'analisi citofluorimetrica sono stati allestiti due tubi, ognuno contenente 200 μl di sospensione cellulare.

Sono utilizzati i seguenti anticorpi:

- **CD90** coniugato ad APC; (marcatore di cellule staminali mesenchimali)
- **CD45** coniugato a FITC; (deve essere assente nelle cellule staminali mesenchimali)
- **CD31** coniugato a PE; (marcatore di cellule endoteliali)

Nel primo tubo è caricato il campione cellulare ma non gli anticorpi al fine di poter effettuare il *gating* sulla popolazione cellulare di interesse; nel secondo tubo viene caricato il campione marcato con gli anticorpi CD45/CD31/CD90. Per ogni tubo sono stati acquisiti 10.000 eventi.

Acquisizione e analisi dei dati

In questa fase è necessario standardizzare il settaggio dello strumento, il numero di eventi letti e il metodo di analisi delle diverse popolazioni cellulari. Il segnale delle fluorescenze viene acquisito in scala logaritmica, mentre gli *scatter* della luce vengono acquisiti in scala lineare. Inoltre, si stabilisce una soglia di *forward scatter* per discriminare le cellule nucleate dai detriti. Lo strumento *FACS CANTO II* utilizzato, consente di analizzare contemporaneamente, in un singolo tubo, i due parametri fisici FSC e SSC e l'espressione di sei differenti antigeni coniugati a diversi fluorocromi. Inoltre, consente di analizzare una singola popolazione cellulare in un campione eterogeneo, delimitando, tramite "Gating", la regione di interesse all'interno del citogramma e selezionando uno o più parametri.

CAPITOLO 4 Risultati

4.1 Isolamento di cellule staminali mesenchimali da tessuto adiposo e mantenimento in coltura

Le CSM sono state isolate con successo dal tessuto adiposo, hanno raggiunto la semiconfluenza (80%) in fiasche da 25 cm^2 in 5-6 giorni, mantenendo il tipico aspetto fibroblastoide. Sono state effettuate subcolture fino al passaggio cellulare al quale è stato possibile osservare il mantenimento del fenotipo caratteristico e apprezzabili livelli di vitalità in coltura. Per 4 campioni, è stato possibile osservare crescita cellulare fino al decimo passaggio (***Figura 4***), per gli altri campioni si è proceduto, in media, fino alla quinta subcoltura.

Passaggio 0 ***Passaggio 6*** ***Passaggio 10***

Figura 4: CSM estratte da tessuto adiposo a diversi passaggi cellulari.

4.2 Controlli microbiologici

I controlli microbiologici, eseguiti sui campioni di tessuto adiposo, al momento del prelievo, e sulle cellule, eseguito il protocollo di estrazione, sono risultati negativi a contaminazioni da batteri e miceti. Si ha quindi conferma che il prelievo del tessuto e la manipolazione delle colture cellulari sono stati condotti in condizioni di sterilità.

4.3Caratterizzazione delle CSM

1. Saggio CFU

Il saggio di verifica dell'efficienza clonogenica delle cellule in coltura è stato effettuato su tutti i campioni ai passaggi cellulari 1, 3, 5 facendo distinzione tra le colture di cellule provenienti da tessuto adiposo sottocutaneo e tessuto adiposo viscerale (***Figura 5***).

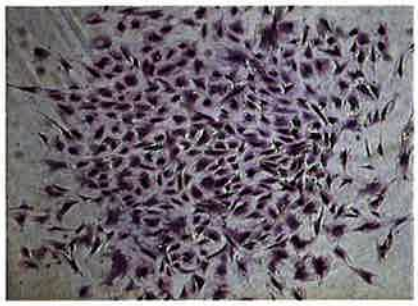


Figura 5: Colonia di cellule dopo colorazione Giemsa

2. Differenziamento

Le CSM isolate mostrano capacità di differenziamento verso le tre linee cellulari mesodermiche condrocitica, osteocitica, adipocitica.

- Condrogenesi

La formazione di aggregati tridimensionali è stata osservata nelle provette a fondo conico contenenti NH ChondroDiff Medium, ma non in quelle di controllo in cui è stata seminata la stessa concentrazione di cellule in terreno di mantenimento.

La colorazione ematossilina-eosina, effettuata sulle sezioni del nodulo fissate su vetrino, ha evidenziato un'organizzazione strutturale delle cellule assimilabile a quella cartilaginea. ***(Figura 6)***

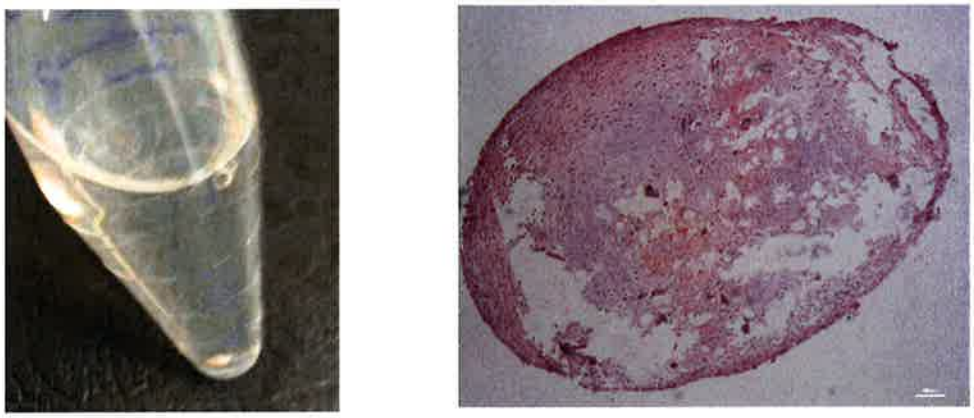


Figura 6: a) Provetta a fondo conico in cui si osserva formazione del l nodulo; b) Colorazione ematossilina-eosina di CSM differenziate in condrociti.

- Osteogenesi

Le CSM coltivate in OsteoDiff Medium mostrano fenotipo cuboidale, continuano a proliferare attivamente e formano aggregati cellulari. Dopo colorazione "von Kossa" delle cellule indotte al differenziamento, è possibile notare la deposizione di matrice

extracellulare calcificata visualizzabile in nero grazie alla precipitazione dei sali d'argento. Nelle cellule seminate con il solo terreno di mantenimento il fenotipo non ha subito cambiamenti (***Figura 7***).

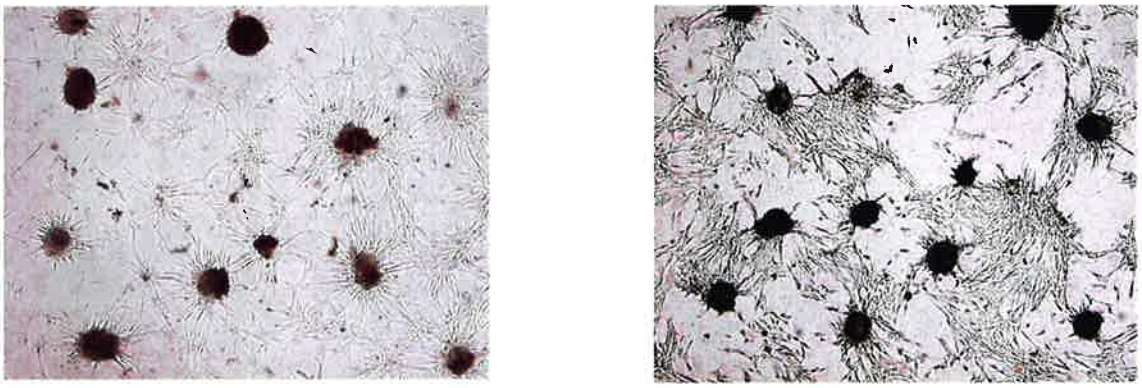


Figura 7: a) Ingrandimento 5X di CSM differenziate in osteociti; b) colorazione von Kossa di CSM differenziate in osteociti.

- Adipogenesi

Dopo 4-5 giorni, le CSM poste in coltura con MesenCult Adipogenic Medium formano numerosi accumuli lipidici in sede citoplasmatica. L'accrescimento in dimensione delle gocciole lipidiche è stato verificato nelle successive osservazioni. Al 21° giorno dall'induzione del differenziamento è stata effettuata la colorazione Oil Red O ed ematossilina che permette di mettere in evidenza i nuclei cellulari in blu e i depositi di grasso in rosso. Non si è osservato differenziamento nelle cellule controllo (***Figura 8***).

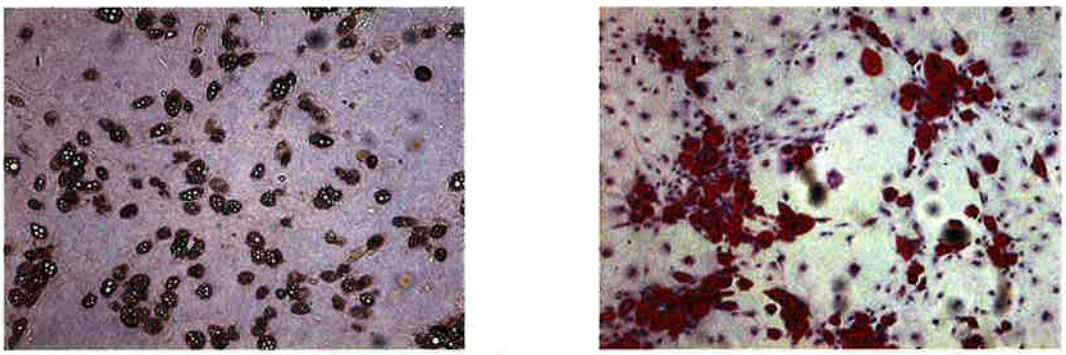


Figura 8 : a) differenziamento delle cellule in adipociti; b) colorazione Oil Red O di CSM differenziate in adipociti che evidenzia i nuclei cellulari in blu e gli accumuli lipidici in rosso; c) colorazione delle cellule controllo.

4.4 Differenziamento Endoteliale

Le variazioni morfologiche, imputabili a differenziamento delle cellule in terreno di coltura verso la linea cellulare endoteliale, risultano apprezzabili già dopo il primo passaggio cellulare e risultano evidenti fino al 5 passaggio, dopo il quale si osserva un graduale rallentamento dell'attività proliferativa. (***Figura 9***).

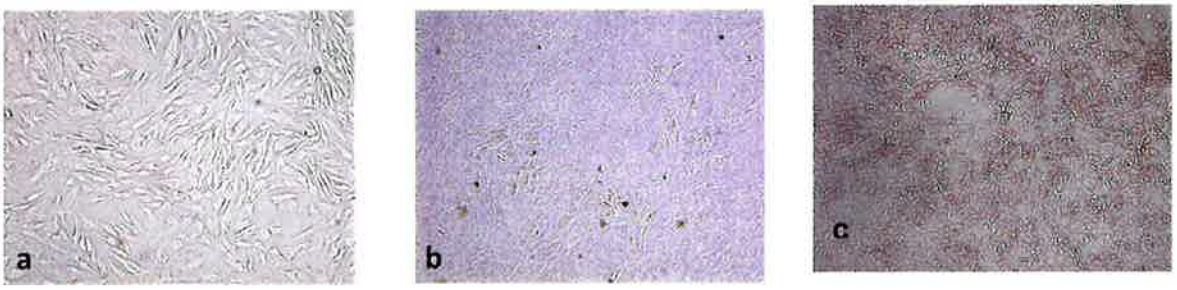


Figura 9: a) cellule non differenziate che mostrano caratteristico aspetto fibroblastoide; b) e c) cellule indotte al differenziamento in senso endoteliale che mostrano cambiamento morfologico.

4.5 Analisi di espressione genica

L'espressione dei geni di staminalità nei 16 campioni è stata quantificata sulle cellule da passaggio 0 a passaggio 5. I livelli di espressione sono risultati sovrapponibili a quelli riportati in letteratura. Ad una fase di decremento, osservata al primo passaggio, verosimilmente da attribuire all'adattamento delle cellule alla condizione *in vitro*, segue un incremento e quindi una stabilizzazione d'espressione di tutti e tre i geni presi in esame. Ciò è biologicamente plausibile poiché, come è noto, i geni *OCT-4*, *SOX-2* e *NANOG*, marcatori di multipotenza, regolano vicendevolmente la loro espressione.

La ***Figura 10*** mostra i grafici relativi alle medie di Delta Ct (ΔCt) derivati dalla differenza tra il Ct del singolo gene e il Ct del gene housekeeping GAPDH. I grafici vanno interpretati tenendo conto che i livelli di ΔCt sono inversamente proporzionali all'espressione del gene. Per il calcolo delle medie sono stati presi in considerazione solo i campioni i cui Ct sono risultati inferiori a 40 (ciclo soglia).

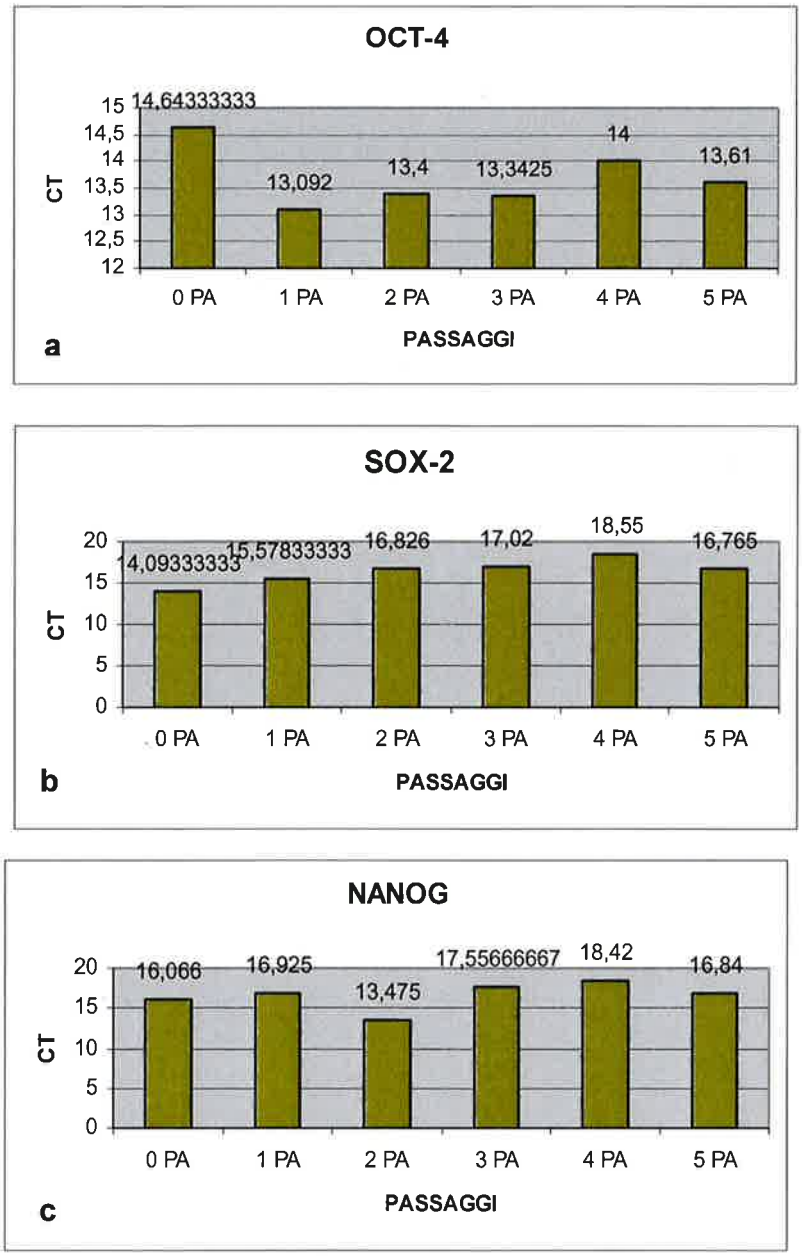


Figura 10: Grafici delle medie dei ΔCt ***dei geni di staminalità.***

L'analisi dei dati ottenuti dalla Real-Time PCR è stata effettuata con il programma REST 2009 *(Relative Expression Software Tool)*. Il modello matematico usato in questo software è basato sull'efficienza della PCR e sulla differenza ottenuta sottraendo i valori di Ct del gene target dai valori di Ct del gene housekeeping (*ΔCt housekeeping-sample*). La significatività è settata ad un valore di *P-value* ≤0,05.

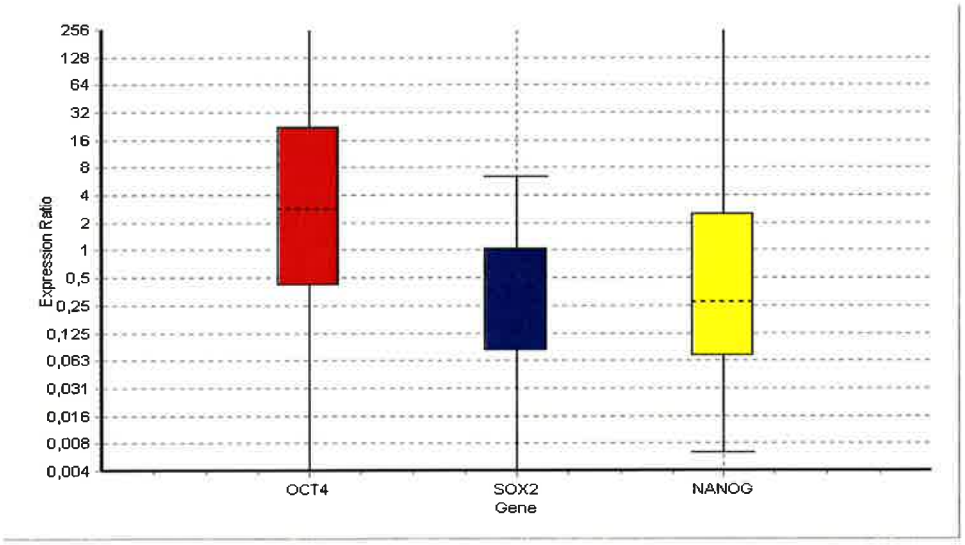
REST analizza se vi sono delle differenze di espressione tra un "gruppo controllo" ed un "gruppo campione", andando a valutare se vi è *up* o *down regolazione* dell'uno rispetto all'altro. I dati ottenuti vengono rappresentati in un box-plot.

L'analisi statistica è stata condotta paragonando i livelli di espressione dei geni di staminalità *OCT-4*, *SOX-2* e *NANOG* nelle CSM tenute in coltura dal passaggio 1 al

passaggio 5 (gruppo campione o *sample group*) rispetto ai livelli di espressione degli stessi geni a passaggio 0 (gruppo controllo o *control group*).

I risultati hanno dimostrato che l'espressione di ciascuno dei tre geni di staminalità non è differente dal punto di vista statistico e che i livelli di espressione si sono mantenuti costanti fino a quinto passaggio.

La ***figura 11*** mostra i box plot estrapolati dal software quando i livelli di Ct ottenuti al passaggio 5 sono paragonati ai livelli di Ct a passaggio zero, per ciascun gene.



OCT4 sample group is not different to control group. P(H1)=0,701

SOX2 sample group is not different to control group. P(H1)=0,089

NANOG sample group is not different to control group. P(H1)=0,518

Figura 11: Box plot relativo ai geni OCT-4, SOx-2 e NANOG paragonati tra i passaggi cinque ed i passaggi zero, accompagnati da P-value che dimostra un'espressione di geni paragonabile.

L'espressione dei tre geni di staminalità è stata valutata anche sui passaggi cellulari da 0 a 5, mantenuti in terreno di differenziamento endoteliale EGM-2. La ***figura 12*** mostra i grafici relativi al confronto tra le medie dei ΔCt dei geni *OCT-4*, *SOX-2* e *NANOG* esaminati nelle cellule in D-MEM e nelle cellule EGM-2.

Nelle cellule in D-MEM, si nota che a passaggio 0 e a passaggio 5 i livelli di espressione dei tre geni sono sovrapponibili. Nelle cellule in EGM-2, invece si nota un notevole decremento di *OCT-4* e *SOX-2* e l'assenza di espressione del gene *NANOG*.

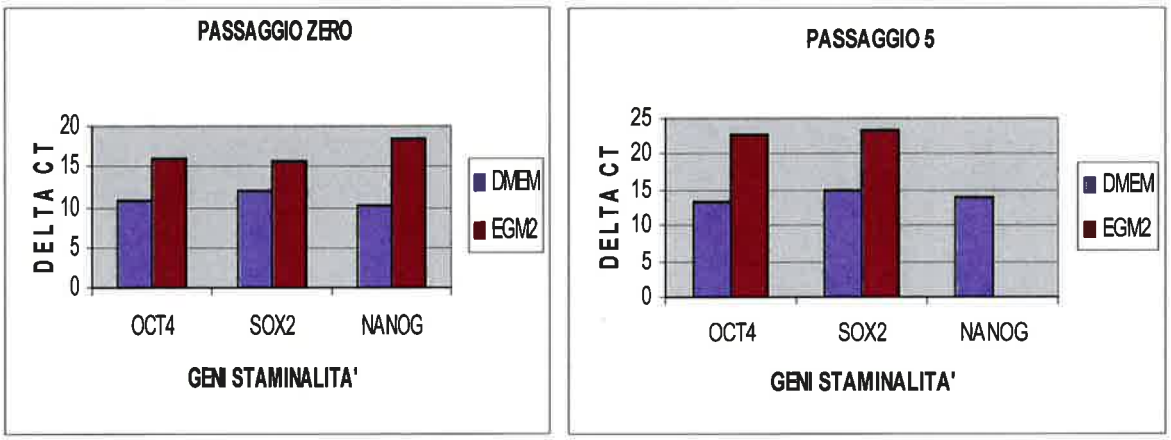


Figura 12: ΔCt per i geni OCT-4, SOX-2 e NANOG tra cellule in D-MEM e cellule in EGM-2 a passaggio 0 (a) e a passaggio 5 (b).

Infine sono stati valutati i geni di differenziamento endoteliale CD31, CD144 e CD146, sui passaggi cellulari da 0 a 5, in D-MEM ed in EGM-2. I dati ottenuti sono ancora preliminari perché si riferiscono ad una limitata casistica di campioni. Tuttavia, risulta già evidente che le cellule mantenute in EGM-2 mostrano più alti livelli di espressione dei geni di differenziamento. La tabella 3 mostra i dati estrapolati dall'analisi REST mettendo a confronto il quinto passaggio cellulare in EGM-2 (sample group), con il quinto passaggio in D-MEM (control group). Come si può notare, l'espressione dei tre geni OCT-4, SOX-2 e NANOG risulta down-regolata nelle cellule in EGM-2 in maniera statisticamente significativa. Di contro, i geni coinvolti nel differenziamento endoteliale CD31, CD146 e CD144 risultano up-regolati nelle cellule mantenute in EGM-2, in maniera statisticamente significativa.

Gene	Type	Reaction Efficiency	Expression	Std. Error	95% C.I.	P(H1)	Result
GAPDH	REF	1,0	1,000				
OCT4	TRG	1,0	0,002	0,002 - 0,002	0,002 - 0,002	0,000	DOWN
SOX2	TRG	1,0	0,003	0,003 - 0,003	0,003 - 0,003	0,000	DOWN
NANOG	TRG	1,0	0,000	0,000 - 0,000	0,000 - 0,000	0,000	DOWN
CD31	TRG	1,0	129,787	129,787 - 129,787	129,787 - 129,787	0,000	UP
CD146	TRG	1,0	1.112,816	1.112,816 - 1.112,816	1.112,816 - 1.112,816	0,000	UP
CD144	TRG	1,0	5,352	5,352 - 5,352	5,352 - 5,352	0,000	UP

Tabella 3: Risulati estrapolati dal software REST paragonando i passaggi 5 di cellule mantenute in EGM-2 e i passaggi 5 di cellule mantenute in D-MEM.

4.6 Analisi immunofenotipica

L'analisi immunofenotipica è stata condotta sulle cellule mantenute in terreno basale D-MEM e sulle cellule in terreno di differenziamento endoteliale EGM-2 da passaggio 0 a passaggio 5. Le cellule acquisite tramite citofluorimetria mostrano dimensioni e granulosità eterogenee e si disperdono nel box plot inerente ai parametri fisici FSC e SSC. Pertanto, a seguito dell'acquisizione, è stato effettuato un gating per prendere in considerazione le cellule con parametri fisici più omogenei.

Per prima cosa è stato acquisito il Bianco, ovvero il campione costituito da 200 ul di sospensione cellulare senza anticorpi, per scartare la fluorescenza di base, intrinseca dei campioni, quindi sono stati settati gli assi per le successive analisi.

La presenza dell'antigene di superficie CD90 e la contemporanea assenza di CD45, hanno confermato che tutte le cellule analizzate, ovvero, sia quelle mantenute in D-MEM che quelle in EGM-2, a tutti i passaggi cellulari, sono cellule staminali di tipo mesenchimale. E' stata inoltre valutata l'espressione del marcatore endoteliale CD31 su tutti i passaggi cellulari. L'espressione di CD31 è risultata assente nelle cellule mantenute in D-MEM a tutti i passaggi ***(figura 13)*** mentre è stata riscontrata su tutti i passaggi cellulari mantenuti

in terreno di differenziamento endoteliale EGM-2. In particolare, l'espressione del CD31 a passaggio 0 in EGM-2 è pari al 26% circa della popolazione analizzata (***figura 14***). Tale percentuale cresce a 61,2% a passaggio 2 (***figura 15***), a dimostrazione di una selezione del fenotipo endoteliale durante il mantenimento in coltura. Tuttavia, la percentuale di cellule positive al CD31 non supera questo valore nei vari passaggi successivi. Ciò fa pensare che la popolazione di cellule endoteliali ottenuta non sia completamente pura ma che siano presenti cellule mesenchimali non differenziate.

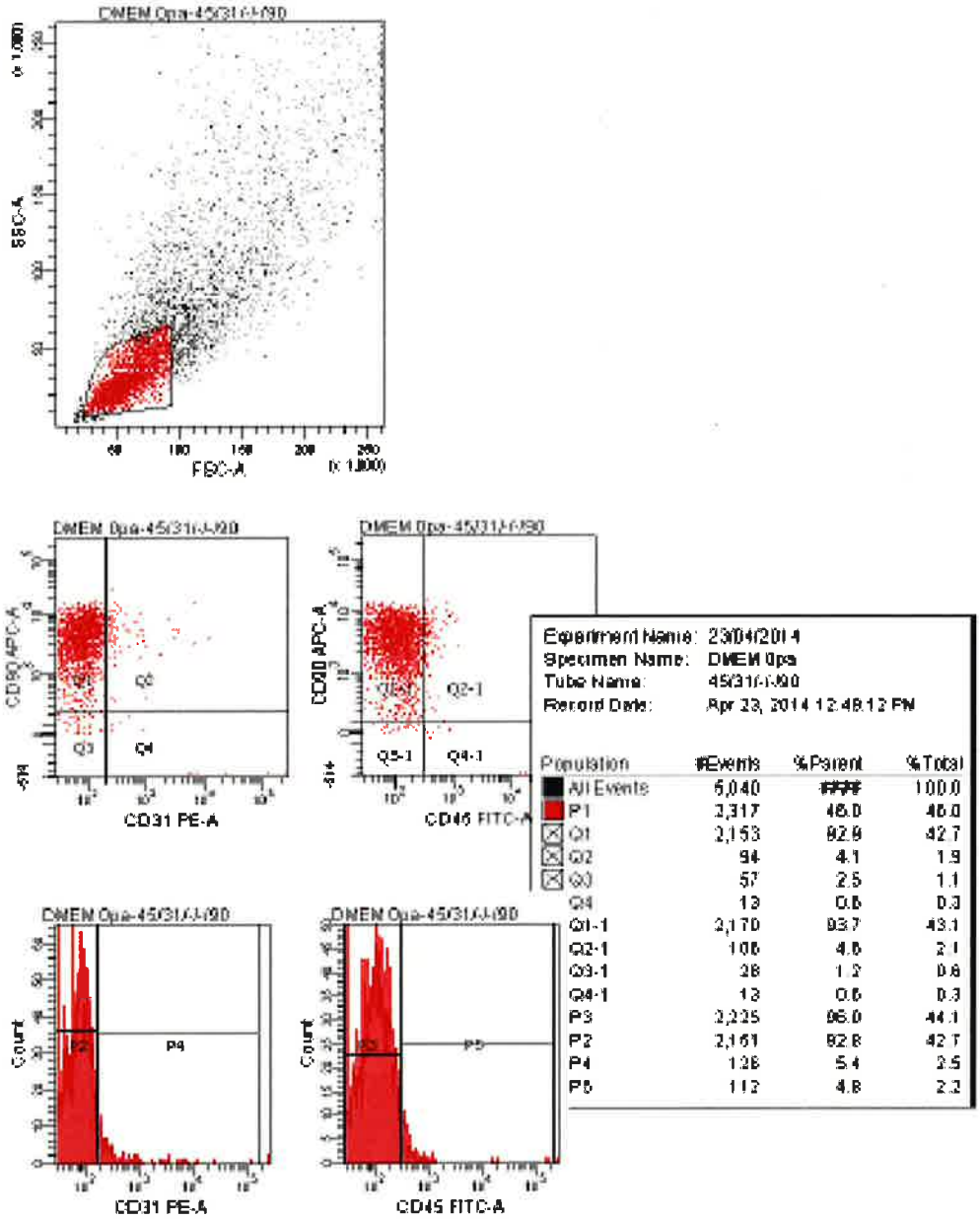


Figura 13: Analisi immunofenotipica di CSM in terreno D-MEM a passaggio 0. Il primo plot mostra tutta la popolazione cellulare; in rosso è evidenziato il gate (P1) della popolazione cellulare più omogenea, presa in esame nei plot successivi. I plot più piccoli mettono in evidenza la presenza di CD90 nella totalità della popolazione e l'assenza di CD45 e CD31, sia sotto forma di diagramma di dispersione che sotto forma di istogrammi. In tabella sono riportate le percentuali di espressione, riferite alla popolazione P1 selezionata.

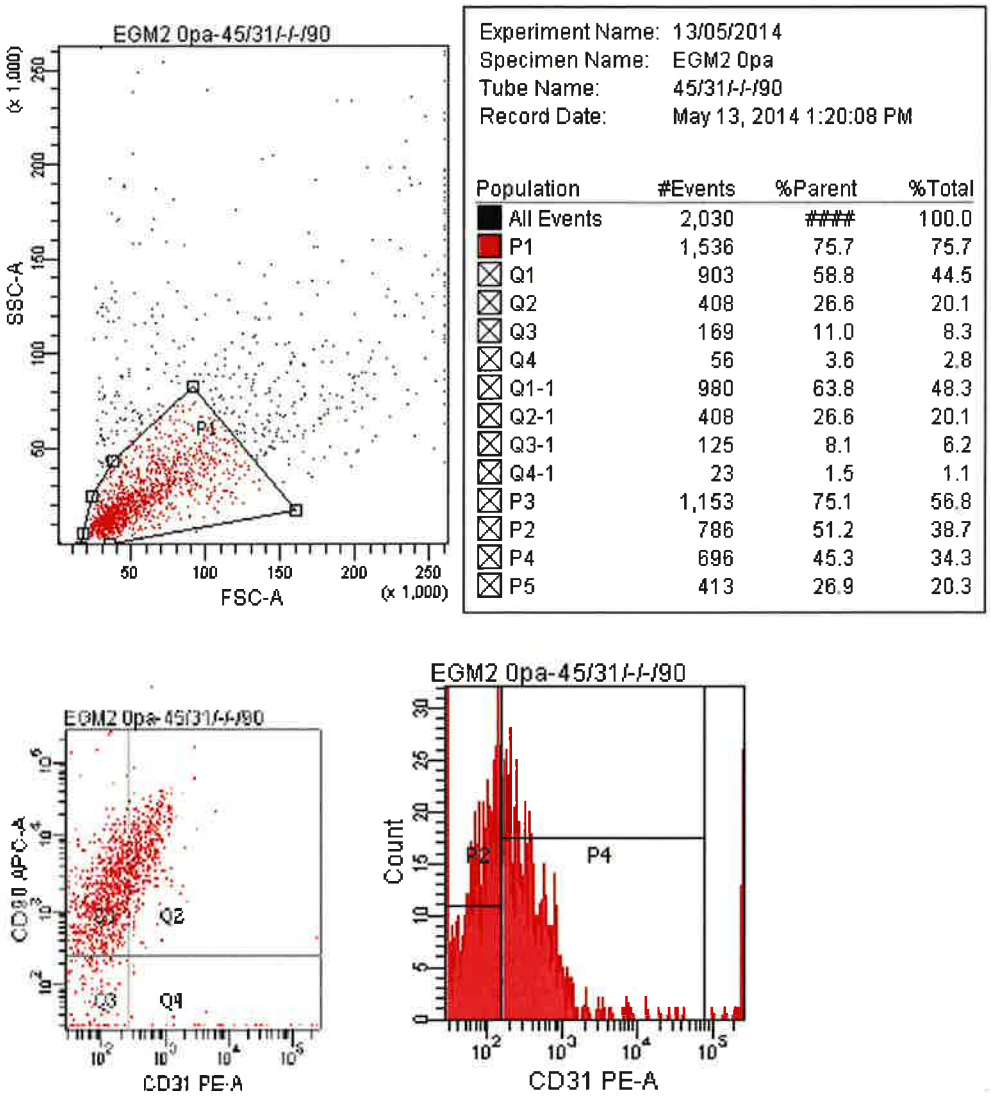
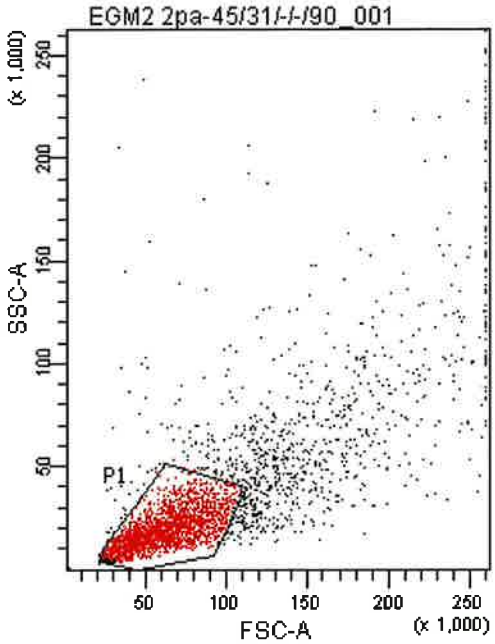
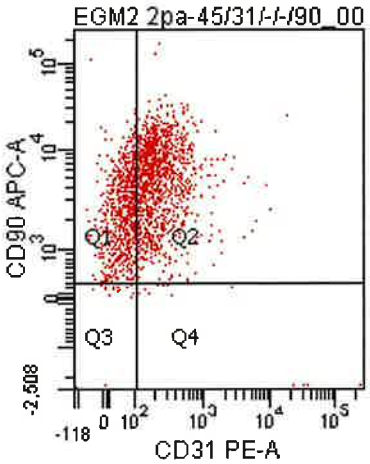


Figura 14: Analisi immunofenotipica di CSM in terreno EMG-2 a passaggio 0. La totalità delle cellule è positiva per CD90. Sia dal plot a dispersione che da quello ad istogramma si evidenzia un positività al CD31 di il 26.6% (Q2).



Experiment Name: 21/03/2014_001
Specimen Name: EGM2 2pa
Tube Name: 45/31/-/-/90_001
Record Date: Mar 21, 2014 2:47:...

Population	#Events	%Parent	%Total
All Events	3,185	####	100.0
P1	2,106	66.1	66.1
P2	1,201	57.0	37.7
P3	677	32.1	21.3
Q1	766	36.4	24.1
Q2	1,288	61.2	40.4
Q3	31	1.5	1.0
Q4	21	1.0	0.7
Q1-1	690	32.8	21.7
Q2-1	1,365	64.8	42.9
Q3-1	36	1.7	1.1
Q4-1	15	0.7	0.5
P4	898	42.6	28.2
P5	1,411	67.0	44.3



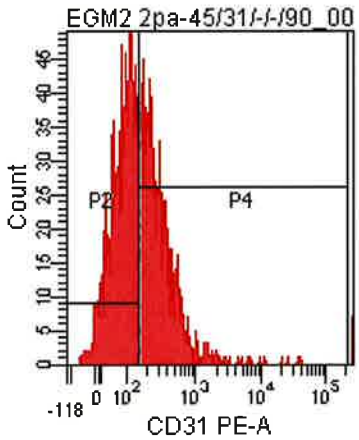


Figura 15: Analisi immunofenotipica di cellule staminali mesenchimali in terreno EMG-2 a passaggio 2. La totalità delle cellule è positiva per CD90. Sia dal plot a dispersione che da quello ad istogramma si evidenzia un positività al CD31 del 61.2% (Q2).

CAPITOLO 5: Conclusioni

La medicina rigenerativa è un settore interdisciplinare volto alla riparazione, alla sostituzione e alla rigenerazione di tessuti ed organi danneggiati, attraverso l'uso di cellule manipolate *ex vivo*. La disfunzione endoteliale è una complicanza comune a numerose malattie, tra cui la malattia coronarica, il diabete mellito, l'ictus, la disfunzione erettile e l'insufficienza renale. Una strategia per ripristinare la funzione endoteliale è l'angiogenesi terapeutica indotta tramite la rivascolarizzazione del tessuto ischemico. Infatti, fisiologicamente, a seguito di un danno endoteliale, le cellule progenitrici endoteliali endogene (EPC) vengono mobilizzate dal midollo osseo per favorire la neovascolarizzazione e il ripristino dell'endotelio danneggiato. L'uso di cellule staminali per il trattamento di malattie correlate a disfunzioni endoteliali rappresenta una delle aree di ricerca più importanti nel campo dell'ingegneria tissutale e della medicina rigenerativa. Esse infatti vengono considerate una valida alternativa alle EPCs, grazie alla loro spiccata plasticità.

Il presente studio ha dimostrato che le cellule staminali mesenchimali (CSM) possono essere facilmente isolate dal tessuto adiposo di ratto Wistar ed esprimono livelli costati di mRNA per *OCT-4*, *SOX-2* e *NANOG* (marcatori genetici di staminalità) durante le successive sottoculture, mostrando, dunque, un mantenimento delle caratteristiche di staminalità. Tale risultato è stato confermato dai dati derivanti dallo studio immunofenotipico che hanno evidenziato contestualmente una consistente espressione del marcatore di cellule staminali mesenchimali, CD90 e l'assenza del CD45[53].

Le CSM prelevate dal tessuto adiposo sono state inoltre caratterizzate valutando anche l'attitudine all'aderenza al materiale plastico, la presenza della tipica morfologia fibroblastoide e il potenziale clonogenico. In particolare, le CSM isolate hanno mantenuto la loro tipica morfologia fibroblastoide ed un ritmo proliferativo costante per almeno 10 passaggi cellulari. Pertanto, si sono rivelate cellule con un elevato potenziale proliferativo e una notevole capacità di differenziamento verso differenti linee cellulari, tra cui le cellule endoteliali. In particolare, il differenziamento in senso endoteliale è stato realizzato quando tali cellule sono state poste in terreno di coltura contenente fattori induttivi quali il VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor), l'FGF (Fibroblast Growth Factor), l'EGF (Epidermal Growth Factor), l'Acido Ascorbico (Vit. C), l'Hydrocortisone, il Long R3-IGF-1 (Recombinant Insulin-Like Growth Factor), l'Eparina. La conferma dell'avvenuto processo di differenziamento si evince dai risultati derivanti dall'analisi di espressione

genica, relativa ai geni marcatori endoteliali (*CD31, CD144 e CD146*) che evidenzia come i livelli di mRNA, di ciascun marcatore siano up-regolati durante i passaggi successivi in coltura, mentre, di contro, risultano down-regolati i geni che determinano le caratteristiche di staminalità (OCT-4, SOX-2 e NANOG). Anche i risultati dello studio immunofenotipico evidenziano la progressiva comparsa di uno dei marcatori di cellule endoteliali per eccellenza, il recettore CD31.

Il tessuto adiposo è ubiquitariamente distribuito nell'organismo e la facilità con cui può realizzarsi il suo prelievo, ovvero, attraverso tecniche relativamente semplici e poco invasive per l'animale, fa sì che tale distretto venga considerato una fonte d'eccellenza per l'approvvigionamento di CSM. La dimostrazione, *in vitro*, della plasticità posseduta dalle CSM che le rende capaci di differenziare non solo verso cellule della linea mesodermica (adipociti e osteociti) ma anche verso cellule della linea endodermica (cellule endoteliali), rappresenta un risultato utile per la loro possibile applicazione nella terapia di malattie da danno a carico dell'endotelio.

RINGRAZIAMENTI

Ringrazio la Dott.ssa Annalisa Guercio, direttore dell'Area Diagnostica Virologica dell'Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Sicilia "A. Mirri", per avermi accolto nel suo laboratorio, dove in questi ultimi anni ho imparato moltissimo e dove ho conosciuto persone meravigliose. La ringrazio soprattutto per avermi dato la possibilità di lavorare a questo progetto sulle cellule staminali, che mi hanno da sempre appassionata.

Ringrazio la Dottoressa Cannella, responsabile scientifico dell'IZS Sicilia del progetto a cui ho preso parte, e tutta l'equipe dell'area diagnostica virologica per la professionalità e la disponibilità mostratami.

Ringrazio le colleghe (ma soprattutto amiche) Gera Buttaci, Santina Di Bella e Francesca Dioguardi per avermi accompagnato in questi anni e par l'affetto dimostrato, grazie Crush!

Ringrazio anche il Prof. Lo Monte che non è soltanto il mio relatore ma è stato mio tutor durante tutto il mio percorso seguendomi sempre da vicino ma anche da lontano. Ringrazio il Professore e il suo gruppo, in particolare la Dott.ssa Gioviale, Vincenzo, Francesco, Alida, Giuseppe, Stafania per il loro impegno nel creare i presupposti per un futuro diverso in cui le Biotecnologie trovano finalmente applicazione e diventano uno strumento importante per la ricerca. La mia riconoscenza va al Prof. Lo Monte per la sua determinazione e passione nel creare una collaborazione interdisciplinare tra medici, biotecnologi e biologi nel campo della medicina rigenerativa e per i suoi progetti, che per molti sembreranno fantascienza, ma in cui io invece credo molto e spero di poter continuare il mio percorso in questo campo.

Infine, ma di certo non per ultimo, ringrazio la mia famiglia e tutte le persone a me care per essermi state vicine da sempre e fino a questo ennesimo traguardo e perchè so che lo faranno ancora e che ci saranno sempre! Un grazie al mio amato Papà che giorno per giorno mi dimostra il suo amore incondizionato; alla mia Mamma che mi ha sempre incoraggiata e continua a farlo, dandomi la forza di affrontare tutto a testa alta; al mio compagno Michele che mi ha insegnato ad essere determinata in tutto quello che faccio; alla mia sorellina Silvia per la dedizione che mette in ciò che fa e che inconsapevolmente mi trasmette; alle mie adorate Nonne, che gioiscono dei miei successi senza tenere in conto che il merito è anche loro; ad Achille, il mio cane, per l'affetto che mi da sempre, senza pretendere nulla in cambio; ad Alice, la mia amica e compagna di viaggio, augurandomi di averla accanto per tutti i momenti che segneranno le nostre vite.

Bibliografia

i Stocum DL. Stem cells in regenerative biology and medicine.Wound Repair Regen. 2001; 9(6): 429-42.

ii Cai J, Weiss ML, Rao MS. In search of stemness. Exp Hematol 2004;32:585-598

iii Ulloa-Montoya F, Verfaillie CM, Hu WS. Culture systems for pluripotent stem cells. Cell Stem Cell 2005. 100 (1): 12–27

iv Ulloa-Montoya F, Verfaillie CM, Hu WS. Culture systems for pluripotent stem cells. Cell Stem Cell 2005. 100 (1): 12–27.

v Zuk P, Zhu M, Ashjian P,Daniel A. De Ugarte D.A. Human Adipose Tissue Is a Source of Multipotent Stem Cells. Mol Biol Cell. 2002 ; 13(12): 4279–4295

vi Rao M.S. Stem sense: a proposal for the classification of stem cells. Stem Cells Dev 2004; 13(5):452-455.

vii Evans MJ, MH. Kaufman. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. Nature 1981; 292 (5819): 154-156.

viii Schroeder T. Haematopoietic Stem Cell Heterogeneity. Cell Stem Cell 2010. 6(3):203-207.

ix Smith S, Neaves W, Teitelbaum S, Prentice D. A, Tarne G.Adult Versus Embryonic Stem Cells.Cell Press. 2007; 126(4):663-676.

x Nakagawa M. and Yamanaka S. Reprogramming of Somatic Cells to Pluripotency. The Cell Biology of Stem Cells. 2010; 695, 215-224.

xi Zhao T, Zhang Z, Rong Z, Xu Y. Immunogenicity of induced pluripotent stem cells. Nature 2011; 474, 212–215.

xii Pountos I, Giannoudis PV. Biology of mesenchymal stem cells.Injury, Int. J. Care Injured (2005) 36S, S8—S12

xiii BensaidW, Triffitt JT, Blanchat C, et al. A biodegradable fibrin scaffold for mesenchymal stem cell transplantation. Biomaterials 2003;24(14):2497—502

xiv Friedenstein AJ, Gorskaja JF, Kulagina NN. Fibroblast precursors in normal and irradiated mouse hematopoietic organs. Exp Hematol 1976;4(5):267—74.

xv Friedenstein AJ, Piatetzky-Shapiro II, Petrakova KV. Osteogenesis in transplants of bone marrow cells. J Embryol Exp Morphol 1966;16(3):381—90

xvi Tuli R, Seghatoleslami MR, Tuli S, et al. A simple, high-yield method for obtaining multipotential mesenchymal progenitor cells from trabecular bone. Mol Biotechnol 2003;23(1):37—49.

xvii Beahm EK, Walton RL, Patrick CW Jr. Progress in adipose tissueconstruct development. Clin Plast Surg. 2003;30(4):547-58.

xviii Schultz E, Lipton BH. Skeletal muscle satellite cells: changes in proliferation potential as a function of age. Mech Ageing Dev.1982;20(4):377-83

xix Dicker A, Le Blanc K, Astrom G, et al. Functional studies ofmesenchymal stem cells derived from adult human adipose tissue. Exp Cell Res 2005;308:283—90.

xx Kim JH, Jee MK, Lee SY, Han TH, Kim BS, et al. Regulation of Adipose Tissue Stromal Cells Behaviors by Endogenic Oct4 Expression Control. PLoS ONE 2009; 4(9): 7166.

xxi Yuin-Han Loh et al. The Oct4 and Nanog transcription network regulates pluripotency in mouse embryonic stem cells.Nature Genetics 2006; 38.

xxii Pesce M, Schöler HR.Oct-4: control of totipotency and germline determination. Stem Cell 2001; 19 (4).

xxiii Niwa H, Miyazaki J, Smith AG.Quantitative expression of Oct-3/4 defines differentiation, dedifferentiation or self-renewal of ES cells. Nat Genet. 2000;24(4):372-6.

xxiv MacArthur BD, Ma'aya A, and Lemischka I. Systems biology of stem cell fate and cellular reprogramming. Nat Rev Mol Cell Biol. 2009; 10(10): 672–681.

xxv Arthur A, Zannettino A, Gronthos S. The therapeutic applications of multipotential mesenchymal/stromal stem cells in skeletal tissue repair. J Cell Physiol. 2009;218:237-245

xxvi Fujita T, Azuma Y, Fukuyama R, Hattori Y, Yoshida C, Koida M, Ogita K, Komori T. Runx2 induces osteoblast and chondrocyte differentiation and enhances their migration by coupling with PI3K-Akt signaling. J Cell Biol. 2004;166:85-95

xxvii Enomoto H, Furuichi T, Zanma A, Yamana K, Yoshida C, Sumitani S, Yamamoto H, Enomoto-Iwamoto M, Iwamoto M, Komori T. Runx2 deficiency in chondrocytes causes adipogenic changes in vitro. J Cell Sci. 2004;117:417-425

xxviii Akune T, Ohba S, Kamekura S, Yamaguchi M, Chung UI, Kubota N, Terauchi Y, Harada Y, Azuma Y, Nakamura K. PPARgamma insufficiency enhances osteogenesis through osteoblast formation from bone marrow progenitors. J Clin Invest. 2004;113:846-855

xxix Rosen ED, Spiegelman BM. Molecular regulation of adipogenesis. Annu Rev Cell Dev Biol 2000; 16: 145-171

xxx Rosen ED, Spiegelman BM. Molecular regulation of adipogenesis.Annu Rev Cell Dev Biol 2000; 16: 145-171

xxxi Rosen ED, Spiegelman BM. Molecular regulation of adipogenesis. Annu Rev Cell Dev Biol 2000; 16: 145-171

xxxii Tominaga H, Maeda S, Miyoshi H, Miyazono K, Komiya S, Imamura T. Expression of osterix inhibits bone morphogenetic protein-induced chondrogenic differentiation of mesenchymal progenitor cells. J Bone Miner Metab. 2009;27:36-45

xxxiii Choi YH, Burdick MD, Strieter RM. Human circulating fibrocytes have the capacity to differentiate osteoblasts and chondrocytes. Int J Biochem Cell Biol. 2010;42:662-671.

xxxiv Oreffo RO, Kusec V, Romberg S, Triffitt JT. Human bone marrow osteoprogenitors express estrogen receptor-alpha and bone morphogenetic proteins 2 and 4 mRNA during osteoblastic differentiation. J Cell Biochem. 1999;75:382-392.

xxxv Shen B, Wei A, Tao H, Diwan AD, Ma DD. BMP-2 enhances TGF-beta3-mediated chondrogenic differentiation of human bone marrow multipotent mesenchymal stromal cells in alginate bead culture. Tissue Eng Part A. 2009;15:1311-1320.

xxxvi Tsuchiya H, Kitoh H, Sugiura F, Ishiguro N. Chondrogenesis enhanced by overexpression of sox9 gene in mouse bone marrow-derived mesenchymal stem cells. Biochem Biophys Res Commun. 2003;301:338-343

xxxvii Mehlhorn AT, Schmal H, Kaiser S, Lepski G, Finkenzeller G, Stark GB, Südkamp NP. Mesenchymal stem cells maintain TGF-beta-mediated chondrogenic phenotype in alginate bead culture. Tissue Eng. 2006;12:1393-1403

xxxviii Hauner H. The new concept of adipose tissue function. Physiol Behav. 2004;83(4):653-8.

xxxix Ahima RS. Adipose tissue as an endocrine organ. Obesity (SilverSpring). 2006;14 Suppl 5:242S-9.

xl Papineau D, Gagnon A, Sorisky A. Apoptosis of human abdominal preadipocytes before and after differentiation into adipocytes in culture. Metabolism. 2003;52(8):987-92.

xli Huss FR, Kratz G. Adipose tissue processed for lipoinjection shows increased cellular survival in vitro when tissue engineering principles are applied. Scand J Plast Reconstr Surg Hand Surg. 2002;36(3):166-71

xlii Beahm EK, Walton RL, Patrick CW Jr. Progress in adipose tissueconstruct development. Clin Plast Surg. 2003;30(4):547-58.

xliii Gaiba S, Pereira de França L, Pereira de França J, Masako Ferreira L. Characterization of human adipose-derived stem cells. Acta Cir. Bras. [online]. 2012, 27(7):471-476.

xliv Liu Y, Wu J, Zhu Y, Han J.Clin. Therapeutic application of mesenchymal stem cells in bone and joint diseases. Exp Med. 2012 Nov 3

xlv M Ramı´rez et al. Mobilisation of mesenchymal cells into blood in response to skeletal muscle injury., Br J Sports Med 2006;40:719–722.

xlvi Juhas M, Bursac N.Curr Opin Biotechnol .Engineering skeletal muscle repair. Current opinion in biotechnology 2013.

xlvii Tedesco F.S et al."Transplantation of Genetically Corrected iPSC-Derived Progenitors in Mice with Limb-Girdle Muscular Dystrophy" Science Translational Medicine 2012; 4(140).

xlviii Abouassaly M, Peterson D, Salci L, Farrokhyar F, D'Souza J, Bhandari M, Ayeni OR.Surgical management of osteochondritis dissecans of the knee in the paediatric population: a systematic review addressing surgical techniques. Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc 2013.

xlix Strassburg S, Nienhueser H, Björn Stark G, Finkenzeller G, Torio-Padron N.Co-culture of adipose-derived stem cells and endothelial cells in fibrin induces angiogenesis and vasculogenesis in a chorioallantoic membrane model. J Tissue Eng Regen Med. 2013.

l Konno M. et al. Adipose-derived mesenchymal stem cells and regenerative medicine. Development, Growth & Differentiation2013; 55(3)309–318.

li Vartanian, S. M. & Sarkar, R. Therapeutic angiogenesis. Vasc. Endovascular Surg. 2007.41, 173–185.

lii Ning, H., Lin, G., Fandel, T., Banie, L., Lue, T. F. & Lin, C. S. Insulin growth factor signaling mediates neuron-like differentiation of adipose-tissue-derived stem cells. Differentiation. 2008.76, 488–494.

liii Altomare R, Cannella V, Abruzzo A, Palumbo VD, Damiano G, Spinelli G, Ficarella S, Cicero L, Cassata G, Di Bella S, Di Marco P, Purpari G, Gioviale MC, Damiani F, Sinagra E, Pisano C, Marino A, Lo Monte G, Tomasello G, Guercio A, Lo Monte AI. Obtaining Mesenchymal Stem Cells From Adipose Tissue Of Murin Origin: Experimental Study. IJST. 2014. 2 (5).